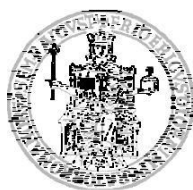


UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"

**DIPARTIMENTO DI MEDICINA VETERINARIA E
PRODUZIONI ANIMALI**



**Dottorato di Ricerca in Biologia, Patologia e Igiene ambientale in
Medicina Veterinaria**

(Coordinatore: Prof. Giuseppe Cringoli)

**Nuove acquisizioni di meccanismi molecolari nei tumori della
vescica dei bovini associati ad infezione da papillomavirus**

Docente Guida:

Ch.mo Prof. Franco Roperto

Candidato:

Dott.ssa Dora Maria Ceccarelli

**XXVIII DOTTORATO DI RICERCA
(2013-2016)**

INDICE

SUMMARY

1.	INTRODUZIONE	5
1.1	I Papillomavirus: filogenesi e tassonomia	11
1.2	Ciclo vitale dei PVs	15
1.3	Le proteine virali.....	17
1.3.1	Early Proteins.....	17
1.3.2	Late Proteins.....	20
1.4	I Papillomavirus bovini (BPVs).....	21
1.4.1	BPV-2 E5.....	24
1.5	Obiettivi prefissati nel triennio di dottorato.....	26
2.	MATERIALI E METODI	28
2.1	Estrazione di RNA.....	29
2.2	RT -PCR per BPV-2, BPV-13 E5, Mincle, FcγR e CXCL2.....	29
2.3	Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) per Mincle.....	30
2.4	Western blot per Mincle	31
2.5	Immunoistochimica Mincle, Fc ε RIγ, CARD9, Syk.....	32
2.6	BPV-2 e BPV-13 rilevazione del DNA e sequenziamento.....	32
2.7	Estrazione dell'RNA e RT-PCR per BPV-2 e BPV-13 E5.....	34
2.8	Western blot per ERas, Akt, pAkt.....	34
2.9	ERas RNA rilevamento e sequenziamento.....	35
2.10	Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) per ERas	36
2.11	ERas e PDGFβR Immunoprecipitazione.....	36
2.12	Immunoistochimica ERas.....	37
2.13	Immunofluorescenza.....	37
3.	RISULTATI	40
4.	BIBLIOGRAFIA	62

SUMMARY

Urinary bladder tumors are very rare in cattle, accounting for 0.01% of all bovine malignancies. These tumors are, instead, commonly encountered in cows that grazed on pastures rich in bracken fern (*Pteridium spp.*). This plant contains toxic principles and its prolonged ingestion is responsible for a clinical syndrome known as chronic enzootic hematuria (CEH). It is believed that bovine deltapapillomaviruses have an important role in the bladder carcinogenesis frequently resulting in this syndrome. Chronic enzootic hematuria (CEH) occurs in several areas worldwide and is very common in Southern Italy, where bracken is particularly widespread.

Papillomaviruses (PVs) are small, non-enveloped, dsDNA viruses with a well-defined tropism for cutaneous and mucosal epithelia in humans and a wide variety of domestic and wild animals. PVs are involved in the pathogenesis of animal and human tumors. The increasing interest to investigate PVs has led to the discovery of novel PV types. Therefore, the classification of papillomaviruses has been updated including 189 types after the incorporation of 28 novel human PV (HPV) and 48 novel animal PV types. Meanwhile, further new PV types such as *Cervus elaphus* papillomavirus (CePV1) and *Equus asinus* papillomavirus (EaPV1) have been described.

Fourteen bovine papillomavirus (BPV) types (1 to 14) have been completely described and assigned to four genera. Bovine papillomavirus (BPVs) types 1/-2/-13 and 14 belong to the genus Deltapapillomavirus that show an epithelial and mesenchymal tropism as they have been detected in cutaneous and mucosa epithelial lining as well as in peripheral blood mononuclear and trophoblast cells.

The major transforming protein encoded by deltapapillomaviruses is the 44-amino acid polypeptide E5. Bovine and human papillomavirus E5 proteins appear to be localized in the membranes of the endoplasmic reticulum, the Golgi apparatus and in the plasma membrane of the host cell. It has been shown that E5 oncoprotein of bovine papillomavirus is responsible for cell transformation via several pathways including the impairment of the V₁-ATPase.

In vitro studies have revealed that BPV E5 oncoprotein can impair the vacuolar H⁺-ATPase proton pump as it is able to bind to its component, the cellular protein 16 kDa subunit c of the V₀ domain. This pump is essential for the acidification of the intracellular organelle compartments and may have an important role in protein sorting and processing. Dysfunction of the H⁺-ATPase proton pump can result in the perturbation of acidification of the endomembrane components and the cytosol. On the contrary, in vivo studies have shown that E5 interacts with the component D of the intracytoplasmic V₁ domain of the H⁺-ATPase proton pump.

Furthermore, it has been suggested that the 16 kDa protein allows E5 to bind to the platelet derived growth factor β receptor (PDGF β R), the activation of which has another important role in bovine bladder carcinogenesis.

It has been shown that platelet derived growth factor β receptor (PDGF β R) is a key partner of bovine Deltapapillomavirus E5 oncoprotein both in vitro and in vivo carcinogenic events.

In the present work, we investigated the expression of ERas oncogene and functional minicell receptor in some urothelial tumors of the urinary bladder of cattle.

Embryonic stem cell-expressed Ras (ERas), a member of the Ras family was initially found in mouse embryonic stem (ES) cells. ERas encodes a constitutively active form of GTPase that binds to and activates phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K), which in turn phosphorylates and activates downstream targets such as Akt.

For the first time, ERas upregulation and overexpression have been investigated in veterinary oncology. We have shown that ERas is a novel partner of Deltapapillomavirus E5 oncoprotein via the activated PDGF β R. This complex is involved in activation of PI3K signal transduction pathway leading to Akt phosphorylation. Indeed, it has a role in molecular cancer network of urothelial cells thus contributing to bovine papillomavirus-associated bladder carcinogenesis.

In addition, this was the first study, in veterinary oncology, about the expression of functional minicell receptor in neoplastic cells. Mincle, macrophage-inducible C-type lectin, is a member of C-type lectin receptors and it plays an important role in anti-mycobacterial

and anti-fungal immunity. It was originally identified as a transcriptional target of NF- κ B. Interleukin-6 (IL-6) is mainly expressed on professional antigen-presenting cells (APCs), such as macrophages, dendritic cells (DCs), B cells, and neutrophils. The expression level of mincle in the steady-state condition is very low; however, it is strongly upregulated after exposure to different inflammatory signals. Mincle appears to be selectively associated with the Fc gamma receptor (Fc γ R) and activates macrophages to produce inflammatory cytokines and chemokines.

It is known that Mincle associates with the adaptor protein Fc γ R required for initiation of signaling by binding Syk which, in turn, activates a signaling cascade through Card9 leading to the induction of cytokine and chemokine such as CXCL2.

We detected mincle expression in papillomavirus-associated urothelial tumors of the urinary bladder in cattle. Morphologically, mincle protein was seen in urothelial neoplastic cells only but not in normal urothelial cells, which might mean that level of mincle expression is so low in steady-state condition as not to be detected with immunohistochemical procedures.

Mincle expression in urothelial tumor cells warrants further study to better understand the role, if any, of this receptor in bladder cancer. Future studies will provide insights in the role of mincle receptor of urothelial cancer cells in antitumoral immunotherapy in comparative medicine as *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) is an attenuated, mincle-mediated mycobacterium used in the therapy of invasive bladder tumors in man.

1. INTRODUZIONE

Le neoplasie a carico della vescica urinaria dei bovini sono alquanto rare e costituiscono solo lo 0,01% di tutte le neoplasie maligne riscontrate in tale specie animale (Meuten, 2002).

In più del 90% dei casi, i tumori della vescica urinaria si accompagnano ad una grave sindrome clinica, a decorso conico, associata ad ematuria intermittente ed anemia e nota come ematuria enzootica cronica (CEH) (Maxie et al., 2007).

Numerose indagini hanno permesso di identificare che, alla base di tale patologia, è presente una condizione di intossicazione cronica da felce aquilina (*Pteridium aquilinum*), pianta cosmopolita contenente numerose sostanze immunosoppressive, clastogene e carcinogenetiche (Smith et al., 1997; Alonso-Amelot et al., 2002; Yamada et al., 2007) associata ad infezioni virali.

Infatti, negli ultimi decenni, diversi studi hanno evidenziato una stretta correlazione tra infezione da parte di alcuni Deltapapillomavirus bovini, in particolare il papillomavirus bovino di tipo 1 (BPV-1) e di tipo 2 (BPV-2), ingestione di felce e comparsa di neoplasie vescicali.

Queste neoplasie sono il risultato di una eziologia multifattoriale. Si ritiene, infatti, che ci sia un'azione sinergica tra fattori oncogeni chimici e fattori oncogeni biologici nel determinismo di tali eventi carcinogenici.

Il ruolo di BPV-1 e di BPV-2 nella carcinogenesi della vescica urinaria è stato per la prima volta ipotizzato da Olson nel 1965, le cui ricerche suggerirono una possibile azione sinergica tra papillomavirus e sostanze della felce; solo nel 1992, Campo et al. sono riusciti ad isolare il DNA di BPV-2 a livello di neoformazioni a carico della vescica in bovini alimentati con felce, sia in condizioni naturali che indotte sperimentalmente, confermando, in tal modo, l'importante ruolo di tale virus nella trasformazione neoplastica a carico della vescica urinaria (Campo et al., 1992; Campo et al., 1994; Borzacchiello et al., 2003).

La felce aquilina, appartenente alla classe delle Pteridopsida, famiglia Pteridaceae, è una delle cinque piante più comuni al mondo, diffusa in tutte le aree temperate e subtropicali sia

dell'emisfero settentrionale sia di quello meridionale. E' una pianta erbacea perenne di notevole sviluppo che può raggiungere i due metri di altezza, provvista di un grosso rizoma strisciante da cui emergono le fronde annuali di profilo triangolare (Fig. 1).



Fig. 1. *Pteridium Aquilinum*

Le fronde sono lunghe fino ad un metro con una larghezza che può superare i 50 cm; le spore (sori) sono disposte sui bordi delle foglie protetti dall'orlo della foglia stessa ripiegato; la sporificazione ha inizio in tarda primavera e si protrae per tutta la stagione calda.

Nel nostro paese essa risulta essere presente su tutto il territorio nazionale, isole comprese, fino a circa 2000 metri di altitudine; la sua distribuzione è presente maggiormente nelle aree deforestate a partire da pascoli semi-abbandonati che hanno subito un ritorno alla vegetazione naturale; in tali terreni, infatti, può dare origine ad estese e fitte coperture fino a diventare un vera e propria pianta infestante (Taylor, 1990).

Inizialmente, *Pteridium aquilinum* è stata considerata come singola specie vegetale, ma in realtà, le sono state attribuite diverse sottospecie (Tryon, 1941): *aquilinum*, distribuita a

livello dell'emisfero settentrionale con le varietà *decompositu*, *pubescens*, *feeii*, *latiusculum*, *wrightianum*, *pseudocaudatum* ed *africanum*, e la sottospecie *caudatum*, distribuita nell'emisfero meridionale, che comprende le varietà *caudatum*, *arachnoideum*, *revolutum*, *yarrabense* ed *esculentum* (Tryon, 1941; Taylor, 1990; Smith et al., 1994).

La felce contiene diverse sostanze chimiche ad azione flogogena tra cui le **braxina A, B e C**; in particolare, la Braxina C si rende responsabile di gravi cistiti emorragiche. Contiene, inoltre, sostanze immunosoppressive, mutagene e clastogene come la **quercetina** (Bjieldanes e Chang, 1977; Nakayasu et al., 1986) unitamente a sostanze ad azione squisitamente oncogena quali **ptaquiloside o Aquilide A**, un glicoside norsesquiterpenoide capace di indurre clastogenesi in colture cellulari e carcinogenesi in vivo (Alonso-Amelot et al., 2002). Castillo et al. (1998) hanno inoltre isolato da *Pteridium aquilinum*, varietà *caudatum*, un nuovo glicoside sesquiterpenoide tossico, denominato **Ptaquiloside Z**.

I primi studi circa il potenziale effetto oncogeno della felce vennero eseguiti, negli anni '60, da Rosenberger ed Heesch, i quali descrissero condizioni neoplastiche di tipo polipoide a carico della vescica associate a fenomeni di ematuria in bovini alimentati per lunghi periodi con tale pianta. Nel 1965, studi sperimentali su animali da laboratorio misero in evidenza la tossicità della pianta associata ad un alto potenziale oncogeno (Evans e Mason, 1965). Infatti, i ratti sottoposti a diete contenenti foglie secche di felce sviluppavano adenocarcinomi, e sarcomi multipli intestinali, e/o carcinomi a carico della vescica urinaria; anche l'applicazione sulla cute di ratti bianchi di estratti di urine da bovini nutriti con felce portava allo sviluppo di escrescenze simili a papillomi (Georgijev et al., 1963).

Nel decennio successivo, l'ematuria enzootica veniva riprodotta sperimentalmente in bovini alimentati con felce appena falciate o stoccate come fieno (Pamukcu et al., 1978; Hirono et al., 1984; Shanin et al., 1998), confermando l'importante ruolo svolto da tale vegetale nella genesi dell'affezione.

Studi sperimentali hanno dimostrato che il tempo di esposizione all'ingestione della felce gioca un ruolo cruciale nell'incidenza dello sviluppo dei tumori; infatti, è stata riscontrata un'alta incidenza di tumori della regione terminale dell'ileo in ratti nutriti con felce per un periodo della durata di almeno 4 mesi, mentre il coinvolgimento della vescica insorgeva in

animali alimentati per periodi più lunghi della durata di almeno 8 mesi (Hirono et al., 1970; 1982; 1983).

Le concentrazioni di ptaquiloside nella pianta variano in base al genotipo del vegetale e talvolta possono raggiungere concentrazioni elevate fino all'1,3% della sostanza secca (Smith et al., 1994).

Alcuni autori hanno suggerito che a seconda della più o meno elevata concentrazione di ptaquiloside e, quindi, del genotipo della felce presente sul territorio, la distribuzione geografica dell'ematuria enzootica può notevolmente variare (Shahin et al., 1998); infatti, si ritiene che in aree geografiche dove la malattia è maggiormente presente, la felce contenga una grande quantità di ptaquiloside (300-700 µg/g/s.s.), mentre in aree dove la malattia assume un carattere sporadico, la concentrazione di tale sostanza risulti inferiore a 100 µg/g/s.s. (Smith et al., 1994).

Di particolare interesse è la presenza in altri animali allevati nelle aree in cui è presente la felce aquilina di patologie legate all'ingestione di tale vegetale, quali la **deficienza di tiamina in cavalli e suini** (Somogyi, 1971; Evans, 1976), le **neoplasie** del canale gastrointestinale nei ruminanti (Evans, 1968; McKenzie, 1978; Smith et al., 1988) ed, la **patologia degenerativa a carico dei coni e bastoncelli, cellule nervose della retina, che portano a cecità nella pecora ('bright blindness')**.

La felce aquilina contiene, infatti, anche fattori anti-tiamina, in particolare una **tiaminasi di tipo 1** in grado di separare la molecola di tiamina nelle sue due strutture ad anello. Al contrario dei ruminanti, i quali sono in grado di sintetizzare la tiamina, gli animali monogastrici richiedono la somministrazione esogena di tale aminoacido risultando particolarmente suscettibili all'azione delle tiaminasi presenti nella dieta. I sintomi clinici dell'intossicazione sono essenzialmente di natura nervosa e sono legati a lesioni necrotiche bilaterali cerebrocorticali (**poliencefalomalacia dei monogastrici**) (Evans, 1976).

Per quanto attiene la **degenerazione dei coni e bastoncelli della retina nella pecora ('bright blindness')**, tale patologia è stata descritta nel lontano 1965 da Watson e collaboratori che osservarono una grave stenosi vasale e progressiva atrofia della retina, anomalie sperimentalmente riprodotte mediante somministrazione di estratti essiccati di felce.

Nell'ultimo ventennio, diversi ricercatori hanno, inoltre, posto la loro attenzione sulla possibile assunzione da parte dell'uomo di tali sostanze attraverso il latte e i suoi derivati. Villalobos–Salazar et al. (1989) hanno infatti messo in evidenza una maggiore incidenza di neoplasie dell'apparato gastroenterico in persone che si alimentano di latte e/o formaggi provenienti da bovini allevati in aree endemiche.

L'eziologia dell'ematuria enzootica del bovino è multifattoriale ed appare legata all'effetto sinergico delle sostanze oncogene presenti nella pianta ed all'infiammazione delle vescica sostenuta principalmente dai papillomavirus bovini. La sindrome emorragica acuta è stata descritta in bovini che vengono alimentati con grandi quantità di felce per un periodo di tempo da 1 a 3 mesi. L'Ematuria Enzootica si manifesta, di solito, in bovini adulti di età superiore ai 3 anni, sebbene la sua massima incidenza si osservi intorno ai 7-9 anni di età. Gli animali colpiti sono bovini utilizzati in alpeggio o, in genere, liberi di pascolare in zone ricche di *Pteridium aquilinum*. La malattia non ha carattere stagionale, sebbene le forme acute sono più frequenti in tarda primavera in concomitanza della presenza di germogli teneri particolarmente appetibili. Fenomeni di riacutizzazione sono presenti durante il periodo primavera-estate.

Nelle aree geografiche in cui cresce rigogliosa la felce (*Pteridium spp*) (Fig. 2) i tumori della vescica urinaria si osservano in circa il 90% dei bovini (Pamucku et al., 1976; Gava et al., 2002; Roperto et al., 2010).



Fig. 2. *Pteridium Aquilinum*

I soggetti che più frequentemente sono affetti da Ematuria Enzootica sono animali della stessa mandria, provenienti soprattutto da allevamenti di razze podoliche allocati in zone ricche di felce; quest'ultima viene ingerita in notevoli quantità dagli animali al pascolo, soprattutto quando presente allo stadio germinativo quando si presenta tenera e facilmente commestibile.

Anche pecore e bufali esposti ad ingestione di felce per periodi superiori ai due anni possono contrarre la malattia (Radostitis et al., 1994; Roperto et al., 2013; Virgilio et al., 2015).

1.1 I Papillomavirus: filogenesi e tassonomia

Molti virus a DNA e a RNA sono dotati di potere oncogeno in molte specie animali. Normalmente essi hanno bisogno di una cellula in accentuata attività mitotica per poter replicare interferendo, così, con il ciclo cellulare o con la sintesi delle proteine.

Le cellule che ospitano il virus possono essere permissive o non permissive. Nelle cellule permissive il virus penetra nel nucleo cellulare e porta a compimento la sua replicazione, inibendo quella cellulare, con l'espressione dei geni precoci e tardivi e il conseguente effetto citopatico, cioè la distruzione cellulare senza causare la trasformazione neoplastica.

Nelle cellule non permissive, invece, il virus si integra nel genoma e/o rimane stabilmente nel nucleo della cellula ospite come episoma e induce, generalmente, una infezione abortiva con l'attivazione di geni precoci e la produzione di oncoproteine ad azione trasformante.

Fra i vari virus a DNA i papillomavirus (PVs) sono una categoria di virus particolarmente temuti per il loro potenziale oncogeno.

Il papillomavirus è un virus dotato di genoma a DNA circolare a doppio filamento, privo di envelope e con un capsido icosaedrico. In base alla loro potenzialità oncogenica sono classificati in Low Risk (LR) e High Risk (HR). Alcuni tipi di PVs possono causare tumori benigni, altri invece inducono tumori maligni come il carcinoma della cervice nella donna ed il cancro della vescica nei bovini. Nei carcinomi, a differenza dei tumori benigni dove il DNA rimane episomale, il genoma del virus si può integrare nel genoma della cellula ospite; questo indica che l'integrazione del DNA virale potrebbe svolgere un ruolo per la trasformazione maligna.

Il genoma di tutti i tipi di PVs è essenzialmente diviso in tre regioni (Fig. 3):

E (Early), regione che codifica per le proteine nella fase acuta dell'infezione coinvolte nella replicazione e nella trascrizione virale (E1 ed E2) così come nella trasformazione cellulare (E5, E6, E7); L (Late), regione che codifica, nella fase tardiva dell'infezione, per proteine strutturali del capsido virale quali L1 ed L2, capaci di evocare la risposta immunitaria da parte dell'ospite ed LCR (Long-Control-Region) o URR (upstream regulatory region) regione non codificante (cioè non possiede capacità trascrizionale

autonoma). E' posizionata tra la fine del gene codificante L1 e l'inizio del gene per E6. All'interno di questa regione sono concentrate le sequenze regolatorie richieste per la replicazione e trascrizione virale. La replicazione del DNA di BPV richiede due proteine virali, E1 ed E2. E2 partecipa all'iniziazione della replicazione, favorendo così il legame di E1 all'origine di replicazione.

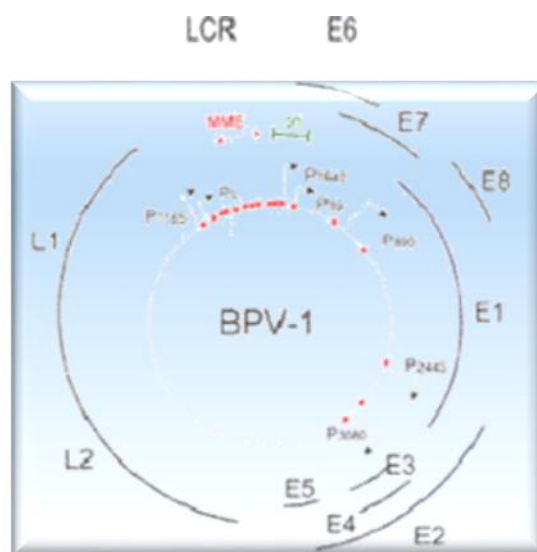


Fig. 3. Struttura del genoma virale

I Papillomavirus (PVs) sono una famiglia di virus oncogeni a DNA, ampiamente distribuiti in natura, con spiccato tropismo per gli epiteli cutanei e delle mucose ed in grado di infettare tantissime specie animali (IARC, 2007; Moody & Laimins, 2010).

Sono virus generalmente specie-specifici ad eccezione del papillomavirus bovino tipo 1, tipo 2, tipo 13 e tipo 14 (BPV-1, BPV-2, BPV-13 e BPV-14) conosciuti infettare anche cavalli, bufali, leoni africani, giraffe ed antilopi. L'infezione da BPV-13 e BPV-14, i più recenti deltapapillomavirus bovini, è stata riportata solo in cavalli e in felini (Lunardi et al., 2013; Munday et al., 2015).

Studi filogenetici hanno suggerito che i PVs evolvono normalmente insieme alle loro specie ospiti, siano esse mammiferi o uccelli, non si ricombinano e, nel corso del tempo, hanno mantenuto la loro organizzazione strutturale genomica per un periodo superiore a cento milioni di anni.

Su tali basi, si è permesso di creare una tassonomia per i PVs, oggi ufficialmente riconosciuta dalla Commissione Internazionale per la Tassonomia dei Virus.

Tradizionalmente i Papillomavirus venivano classificati nella famiglia dei **Papovaviridae** insieme ai Polyomavirus in quanto entrambi mancano di un envelope, sono costituiti da un genoma a DNA a doppio filamento ed all'osservazione ultrastrutturale presentano una notevole similitudine dei capsidi virali.

Tale unificazione tassonomica è stata, poi, abbandonata in quanto, a metà degli anni '80, è risultato chiaro che i Papillomavirus ed i Polyomavirus presentano differenti dimensioni genomiche (5kb vs 8kb), diverse strategie trascrizionali e le loro proteine non risultano essere omologhe.

Tali considerazioni hanno portato, quindi, al riconoscimento della famiglia **Papillomaviridae** a cui appartengono i Papillomavirus (de Villiers et al., 2004).

Alle maggiori branche del grande albero filogenetico comprendente tutti i PVs vengono assegnati i 'Generi', identificati mediante lettere dell'alfabeto greco (α , β , γ , δ , ϵ , ζ , η , θ , ι , κ , λ , μ , ν , χ , \omicron , π); le branche minori costituiscono le 'Specie' ciascuna comprendente gruppi di papillomavirus distinti da un punto di vista genomico.

I Papillomavirus vengono suddivisi in 16 diversi generi in base alle proprietà biologiche e all'organizzazione del genoma.

La comprensione dell'enorme diversità dei PVs, l'ampia distribuzione mondiale, le loro potenziali differenze patogenetiche continuano ad essere oggetto di studio per la ricerca filogenetica e di considerazioni di natura eziologica sulle varianti dei Papillomavirus umani (HPV).

Infatti, il sempre più crescente interesse nello studio dei papillomavirus, ha portato alla scoperta di nuovi tipi di PV (Bottalico et al., 2012; Rogovskyy et al., 2012; Zhu et al., 2013); per cui, la classificazione dei papillomavirus (de Villiers et al., 2004) è stata implementata includendo, allo stato attuale, 189 tipi tra cui 28 nuovi HPV e 48 nuovi PV animali (Bernard et al., 2010). Recenti studi hanno, inoltre, evidenziato nuovi tipi di PV animali quali il Cervus elaphus papillomavirus (CePV1) (Scagliarini et al., 2013), Equus asinus papillomavirus (EaPV1) (Lecis et al., 2014) e due nuove varianti di Bovine Papillomavirus di tipo 7 (BPV-7) (Savini et al., 2016).

1.2 Ciclo vitale dei PVs

Il ciclo vitale dei Papillomavirus (Fig. 4) è strettamente connesso al programma di differenziamento della cellula epiteliale ospite infettata. Ogni strato dell'epidermide rappresenta una fase differente del programma di differenziamento terminale del cheratinocita. Ad ogni stadio di tale programma si trova una precisa fase del ciclo vitale del virus.

Per poter stabilire con successo un'infezione persistente, il virus deve raggiungere, attraverso microabrasioni superficiali della mucosa dell'ospite, le cellule dello strato epiteliale basale (cheratinociti basali). Questo tipo di cellule sono caratterizzate da una spiccata attività proliferativa e sono, quindi, in grado di permettere la persistenza del virus.

Il Papillomavirus penetra all'interno della cellula ospite dove permane in fase latente per anni oppure può andare incontro a replicazione attiva portando alla sintesi di nuove entità virali. Molti individui possono rimanere per tutta la vita portatori sani del virus senza produrre mai lesioni cliniche apparenti. In queste cellule, il DNA virale viene mantenuto stabilmente in forma episomale a copie multiple e replica contemporaneamente al DNA cellulare (una volta per ciclo cellulare), venendo così trasmesso alle cellule figlie ad ogni divisione cellulare. In questa fase vengono espressi solamente i geni precoci del virus (E1, E2, E3, E4, E5, E6 e E7). Si suppone che la trascrizione di tali proteine precoci avvenga con l'ausilio di elementi enhancers costitutivi presenti nella regione LCR (Fields, 1990); inoltre, tali enhancers hanno mostrato possedere una specificità tissutale e cellulare, ragione che potrebbe essere alla base della mancata trascrizione dei geni tardivi nelle cellule dello strato basale dell'epidermide.

A causa delle dimensioni ridotte del loro genoma, questi virus non possono codificare la maggior parte degli enzimi necessari per la replicazione del loro DNA e di conseguenza utilizzano strutture e componenti cellulari dell'ospite. Questo tipo di replicazione, assicura l'instaurarsi di un'infezione del virus persistente nelle cellule basali dell'epidermide.

La replicazione vegetativa del virus, invece, avviene nelle cellule degli strati superiori dell'epitelio (strato granuloso). Queste cellule si trovano ad uno stadio di differenziamento

avanzato e non si ha più la sintesi del DNA cellulare. Paradossalmente, si osserva ugualmente un'intensa replicazione del DNA virale (cioè si formano i DNA che verranno poi racchiusi nei capsidi della progenie virale), l'attivazione dell'espressione dei geni virali tardivi, la sintesi di proteine capsidiche e l'assemblaggio dei virioni.

La formazione della progenie virale completa è presente solo nello strato più esterno dell'epitelio (strato corneo) e i virus assemblati sono espulsi nell'ambiente esterno quando le cellule epiteliali si desquamano. Di conseguenza il virus è trasmesso principalmente attraverso contatto diretto.

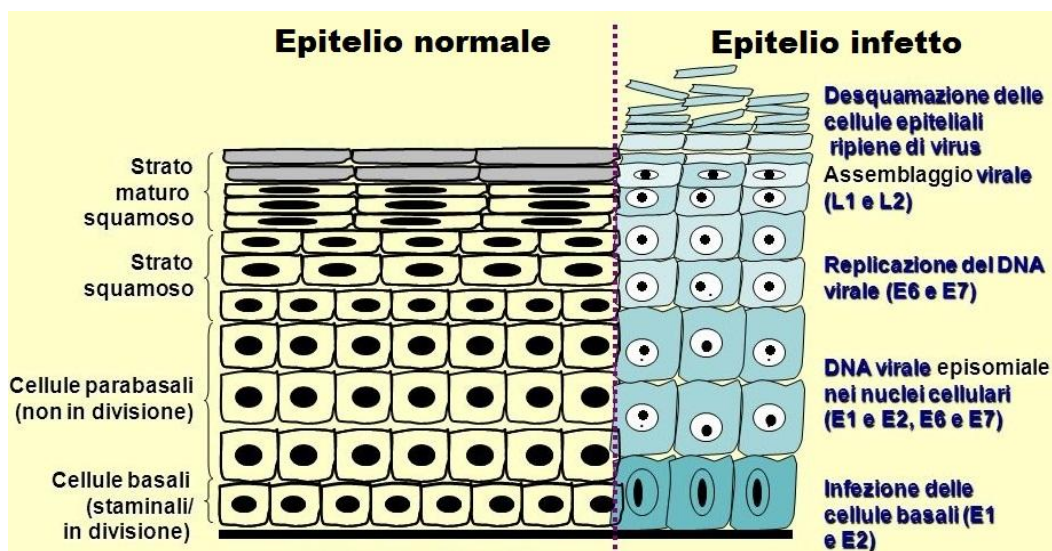


Fig. 4. Ciclo vitale dei PV

1.3 Le proteine virali

1.3.1 *Early Proteins*

La proteina E1 ha una dimensione di circa 68 kDa e viene espressa a bassi livelli nelle cellule Papillomavirus-positive. La sua funzione è di riconoscere e legare l'origine di replicazione in quanto mostra un'attività ATPasica ed elicasica 3'-5' (Hughes and Romanos, 1993; Seo et al., 1993; Yang et al., 1993).

E1 riconosce le sequenze ricche di AT delle origini di replicazione dei PVs che sono localizzate in prossimità del promotore precoce (Frattini and Laimins, 1994; Muller et al., 1997). La proteina E1 mostra un'iniziale bassa specificità di legame con tali sequenze; tale legame viene rafforzato dalla formazione di un complesso con la proteina E2 (Frattini and Laimins, 1994; Dixon et al., 2000; Lu et al., 1993). I siti di legame di E2 sono adiacenti alle sequenze di riconoscimento di E1.

E2 consente il corretto posizionamento di E1 sul sito di origine. Una volta legate al sito attraverso l'azione di E2, le proteine E1 formano esameri che presentano un'alta affinità per il DNA (Sedman and Stenlund, 1998).

Le proteine E1 sono in grado di legare l'enzima DNA polimerasi α della cellula ospite e di indurre il reclutamento dei complessi di replicazione cellulari nell'origine di replicazione virale (Conger et al., 1999; Masterson et al., 1998).

La proteina E2 è una proteina dimerica di 40-45 kDa che regola sia la replicazione del DNA virale che la trascrizione dei geni virali (Laimins, 1998). Strutturalmente si distinguono: la porzione C-terminale che lega una sequenza palindromica di 12 paia di basi, una regione centrale e una terza regione N terminale. E2 è un importante regolatore della replicazione e della trascrizione virale ed è attiva sotto forma di dimeri.

Presenta diversi domini di legame al DNA ed una sequenza di legame a E1. E2 regola la trascrizione virale a livello di promotori precoci. A bassi livelli, E2 si lega a specifiche sequenze di riconoscimento e attiva i promotori precoci, mentre, a concentrazioni elevate, reprime la trascrizione bloccando il legame dei fattori di trascrizione. Il ruolo di E2 come repressore è molto importante nel regolare i livelli di E6 e E7, due importanti oncoproteine

virali e la sua perdita rappresenta il primo stadio di trasformazione neoplastica. Mantenendo bassi i livelli di E6 ed E7 durante lo stadio non-produttivo, E2 assicura la mancata trasformazione neoplastica della cellula.

La proteina E4, nonostante la sua inclusione tra le proteine precoci, è espressa tardivamente nel ciclo di replicazione virale ed è una delle proteine più abbondanti presenti durante il ciclo virale. Il ruolo è legato all'infezione produttiva: sembra possa interagire con il network di filamenti intermedi di cheratina, rendendoli meccanicamente instabili e facilitando così il rilascio delle particelle virali (Doorbar et al., 1991).

La proteina E5 è una piccola proteina idrofobica transmembranaria di tipo II, costituita da 83 aminoacidi nel papilloma virus umano tipo 16 (HPV-16), che risulta essere espressa nei primi stadi dell'infezione ed è presente nell'apparato del Golgi (AG) e a livello delle membrane del reticolo endoplasmatico (RE). L'E5 del papillomavirus bovino tipo 2 è costituita da 44 aminoacidi.

La proteina E6 è una proteina basica costituita da 150 aminoacidi. E6 presenta due strutture "zinc-fingers" e due domini Cys-X-X-Cys ed interagisce con numerose proteine cellulari interferendo con la loro funzione.

Queste proteine appartengono a quattro gruppi generali: fattori di trascrizione, proteine pro-apoptotiche, proteine coinvolte nella formazione e mantenimento dell'architettura cellulare, polarità e adesione, e fattori di replicazione e riparo del DNA. Dato che molte proteine appartengono a più di un gruppo, E6 è capace di sovvertire numerose funzioni cellulari. L'attività più studiata di E6 è la sua abilità ad indurre la degradazione della proteina p53. E6 forma un complesso con un'altra proteina cellulare, la E6-AP (E6 associated protein). Questo complesso si comporta da ubiquitina-ligasi favorendo l'ubiquitinazione della p53 e la sua proteolisi a carico dei proteosomi. Poiché compito primario della proteina p53 è bloccare il ciclo replicativo in fase G1 e promuovere l'apoptosi di cellule che abbiano subito lesioni genomiche, la sua proteolisi, E6-indotta, si traduce in una prolungata sopravvivenza delle cellule infettate e in una loro maggiore proliferazione.

E6 può interferire con la via apoptotica grazie alla sua associazione con Bak, un membro della famiglia Bcl-2, che esercita funzioni pro-apoptotiche. Analogamente agli effetti indotti su p53, E6 induce la degradazione di Bak in modo ubiquitina-dipendente.

Un altro bersaglio cellulare di E6 è la paxillina, una proteina coinvolta nella trasduzione di segnali provenienti dalla membrana plasmatica e diretti al citoscheletro di actina. Solo le proteine E6 dei tipi ad alto rischio sono in grado di legare la paxillina. Si pensa che questa interazione abbia un ruolo fondamentale nel processo di carcinogenesi promossa dall'infezione con HPV ad alto rischio.

La proteina E7 è stato il primo oncogene degli HPV ad essere scoperto ed è la principale responsabile dell'attività trasformante degli HPV ad alto rischio. Le proteine E7 di tutti gli HPV sono piccoli polipeptidi acidi di 98 aminoacidi e sono attive in forma dimerica. Il ruolo principale di E7 riguarda la sua capacità di associarsi alle proteine appartenenti alla famiglia del retinoblastoma (Rb): pRb, p107 e p130.

Le proteine della famiglia Rb, dette anche “pocket proteins”, giocano un ruolo centrale nella regolazione del ciclo cellulare (Dyson, 1998). Sono chiamate proteine “pocket” per la presenza nella struttura tridimensionale di una “tasca” di legame conservata attraverso la quale legano fattori cellulari, come i fattori di trascrizione della famiglia E2F coinvolti nella proliferazione cellulare (Dyson, 1998). La forma attivata di Rb reprime l'attività dei fattori di trascrizione E2F.

Normalmente, nel nucleo delle cellule in fase G1 la proteina pRb forma complessi con l'eterodimero E2F e con altri fattori che attivano la trascrizione dei geni richiesti per l'avvio della fase S, quindi, bloccandone l'azione.

Se la cellula riceve uno stimolo proliferativo, la pRb viene iperfosforilata da alcune chinasi cicline-dipendenti (Cdk4/6- D) e si distacca dai fattori di trascrizione che, liberi di agire, promuovono la replicazione del DNA. Interagendo con la forma attiva ipofosforilata di pRb, la proteina E7 recluta Rb, inattivando il suo compito di inibire i fattori di trascrizione E2F con conseguente attivazione costitutiva dei geni bersaglio di E2F; queste attivano la trascrizione consentendo alla cellula ospite di procedere lungo il ciclo replicativo anche in assenza di stimoli mitogeni esterni.

E' stato dimostrato che l'oncoproteina E7 di HPV è capace di down-regolare l'espressione della proteina pRb legandosi alla μ -calpaina, attivandone quindi la sua attività proteolitica risultante nel clivaggio di pRb. Il sistema delle calpaine è composto da una famiglia di cistein proteasi Ca dipendenti e la loro attività è regolata dai livelli del Ca citosolico. Le calpaine sono una famiglia di proteine, alcune delle quali ubiquitarie (calpaina 1 e calpaina2), altre tessuto-specifiche. Le calpaine risultano essere coinvolte nella motilità cellulare, trasduzione di segnali, progressione del ciclo cellulare, regolazione dell'espressione genica ed apoptosi.

1.3.2 Late Proteins

I geni contenuti nella regione Late (L) codificano per proteine capsidiche. L1 è la proteina maggiore del capsido con peso molecolare 55-60 KDa, mentre L2 è la proteina minore con un peso di circa 70 KDa.

Il capsido è composto da 72 capsomeri. Ogni capsomero è un pentamero di 360 molecole di proteina L1 e da 12 a 36 molecole di proteina L2. La trascrizione di questi due geni dipende dallo stato di differenziazione del cheratinocita.

L1 è la proteina maggiormente antigenica dei PVs, è scarsamente fosforilata e può essere anche glicosilata.

L2 svolge principalmente ruoli di tipo strutturale, ma ha anche diverse funzioni regolatorie, infatti, si lega a recettori secondari; questa interazione avviene dopo il legame del capsido. Partecipa nella determinazione della localizzazione nucleare del virus e l'incapsidazione selettiva del DNA nel capsido virale.

1.4 I Papillomavirus bovini (BPVs)

In medicina veterinaria, i Papillomavirus bovini sono tra i virus animali più studiati per il loro potenziale legame diretto tra infezione virale e neoplasie. A tutt'oggi sono noti quattordici genotipi virali (Lunardi et al., 2013; Munday et al., 2015).

Si rendono responsabili di papillomatosi cutanee, di tumori della vescica urinaria e dell'esofago (Campo, 2002; Wosiacki et al., 2006).

Nei bovini sono stati clonati e sequenziati 14 tipi di PVs (Lunardi et al., 2013) che appartengono ai generi Deltapapillomavirus (BPV - 1, - 2, - 13 e 14), Xipapillomavirus (BPV- 3, - 4, - 6, - 9, - 10, - 11 e - 12) ed Epsilonpapillomavirus (BPV - 5 e - 8). Il BPV - 7 è stato proposto ma non ancora assegnato al genere Dyoxipapillomavirus (Rector et al., 2013).

I Papillomavirus sono virus strettamente specie-specifici e prevalentemente epiteliotropici. Solo i BPV- 1, - 2, - 13 e 14 esprimono anche un tropismo mesenchimale ed infettano numerose specie animali. Essi sono responsabili di sarcoidi equini e di tumori cutanei in giraffe, antilopi capre, leoni africani e in felini domestici.

Benché non ubiquitarie tra i PVs animali, le proteine E4 ed E5 sono ampiamente conservate tra i PVs degli artiodattili. La sequenza amminoacidica dell'E5 di BPV - 13 è quasi identica a quella dell'E5 del BPV - 1 e - 2, differisce solo per un residuo (D, acido aspartico) nel codone 36 al carbossi - terminale della proteina. Tuttavia questa differenza è conservativa; l'acido aspartico al codone 36 della proteina E5 di BPV - 13 mostra proprietà simili all'acido glutammico (E) nelle corrispondenti posizioni delle sequenze di E5 nel BPV - 1 e - 2, suggerendo che la funzione di E5 nel BPV - 13 è conservata.

Dal momento che BPV - 13 e BPV - 14 risultano filogeneticamente vicino ai BPVs - 1 e - 2 e condivide con questi le caratteristiche molecolari, è stato anche dimostrato che risulta coinvolto nel determinismo dei tumori della vescica urinaria dei bovini (Roperto et al., 2015; Roperto et al., 2016 - in press).

I DeltaPV causano un'iniziale trasformazione dei fibroblasti subepiteliali seguita da acantosi plessiforme epiteliale e papillomatosi, mentre gli XiPV (epiteliotropici) inducono papillomi epiteliali senza coinvolgimento dei fibroblasti (Jarrett, 1985).

BPV - 1 causa fibropapillomi del capezzolo e del pene; è coinvolto anche nei tumori uroteliali del bovino; BPV - 2 è responsabile dei papillomi cutanei e fibropapillomi esofagei; è anche esso coinvolto nei tumori uroteliali del bovino; BPV - 4 causa tumori benigni e maligni del tratto superiore gastrointestinale, BPV - 6 di papillomi del capezzolo e BPV - 5 è responsabile di fibropapillomi a grani di riso a livello della mammella (Campo, 2006).

Nei bovini i papillomi normalmente regrediscono dopo circa un anno dalla loro comparsa sebbene in soggetti immunodeficitari essi tendono a diffondere e/o a progredire. Nei bovini allo stato brado l'immunodeficit è causato dall'ingestione di sostanze immunosoppressive contenute nella felce presente nei pascoli e assume un carattere di cronicità (Campo, 2002; Borzacchiello et al., 2003).

La correlazione tra fattori virali, immunologici e chimici e la progressione delle lesioni papillomatose verso i carcinomi è stata descritta sia in condizioni naturali che sperimentali (Jarrett et al., 1978; Campo et al., 1994). Infatti animali infettati con BPV - 4 ed alimentati con fieni privi di felce sviluppavano forme di papillomi che regredivano dopo circa un anno; al contrario, bovini alimentati con la felce sviluppavano papillomi con elevato grado di diffusione attraverso l'oro - e naso - faringe e in alcuni casi davano vita a forme maligne di carcinoma squamoso (Campo et al., 1994).

L'alto grado di associazione, osservato inizialmente, tra il cancro della vescica e l'infezione da BPV-2 suggerì che tale virus potesse giocare nella carcinogenesi un importante ruolo, esaltato proprio dall'ingestione della felce aquilina (Campo et al., 1992). BPV - 1 / 2 infetta l'epitelio della vescica urinaria, forse partendo da un'infezione delle zone paragenitali e/o diffondendo attraverso il sangue (Campo et al., 1992; Roperto et al., 2008 e 2011) e stabilendo un'infezione latente nell'urotelio.

Infatti, nei bovini immunocompromessi, alimentati con felce aquilina, il virus non viene eliminato non stimolando il sistema immunitario e l'infezione latente può riattivarsi (Campo, 1997; 2003; Campo et al., 1994). Il DNA virale presente nelle lesioni vescicali conserva la

capacità di infettare e di iniziare un ciclo replicativo a livello del tessuto. Infatti, il ruolo di BPV - 1 / 2 nella carcinogenesi della vescica urinaria è stato ipotizzato per la prima volta da Olson nel 1965, il quale aveva dimostrato che l'inoculazione cutanea di estratti di tumori spontanei vescicali bovini induceva la formazione di papillomi cutanei e vaginali.

Tali ricerche suggerirono una possibile condizione simbiotica tra papillomavirus e tumori spontanei a carico della vescica; solo nel 1992 Campo e collaboratori sono riusciti ad isolare il DNA di BPV - 2 a livello di neoformazioni a carico della vescica in bovini alimentati con felce, sia in condizioni naturali che sperimentalmente indotte, confermando il suo importante ruolo nell'oncogenesi (Campo et al., 1992).

E' quindi ampiamente accertato che BPV-2 è il papillomavirus più frequentemente coinvolto nelle neoplasie vescicali (Campo et al., 1992; Borzacchiello et al., 2003 e 2007; Lioi et al., 2004; Balcos et al., 2008; Borzacchiello e Roperto, 2008; Roperto et al., 2008).

Come già accennato, BPV-1 e BPV-2, BPV-13 e BPV-14 codificano tre oncoproteine, E5, E6 ed E7; E5 è espressa in un'alta percentuale di neoplasie vescicali del bovino (Campo et al., 1992; Borzacchiello et al., 2003; Wosiacki et al., 2005, 2006; Roperto et al., 2008). Nell'uomo, invece, da studi in vivo e in vitro è emerso che E6 ed E7 sono i principali oncogeni dell'HPV. Ad oggi l'attività trasformante delle oncoproteine E6 ed E7 è ben caratterizzata mentre il ruolo di E5 è ancora poco noto negli HPV (Venuti et al., 2011).

Il ciclo vitale dei PVs è strettamente legato alla differenziazione delle cellule epiteliali infettate ed è stato suggerito che la produzione delle proteine del capsido virale avviene solo nelle infezioni produttive (IARC, 2007), che l'assemblaggio delle particelle virali avviene negli strati granulare e corneo e che le particelle virali vengono rilasciate quando le cellule squamose si disintegrano (IARC, 2007; Graham, 2006).

La proteina E2 è un fattore fondamentale dell'infezione produttiva e persistente ed è il principale regolatore della replicazione del DNA virale e della trascrizione del gene virale (IARC, 2007; Muller et al., 2012). E' stato suggerito che alti livelli di E2 durante il ciclo vitale del virus regolino l'espressione dei geni della fase tardiva L1 e L2, facilitando la nuova progenie virale (IARC, 2007; Johansson et al., 2012). Sembra che E2 svolga un ruolo importante nel traffico intracellulare poiché interagisce con una famiglia di proteine

funzionali coinvolte nel trasporto mediato da vescicole tra Golgi ed endosomi nonché tra endosomi e lisosomi (Muller et al., 2012).

1.4.1 BPV-2 E5

L' E5 del BPV-2 è una piccola proteina idrofobica transmembranaria di tipo II costituita da 44 aminoacidi che risulta essere espressa nei primi stadi dell'infezione sia a livello del citoplasma delle cellule profonde dell'epitelio (Anderson et al., 1997; Burnett et al., 1992; Chang et al., 2001; Venuti et al., 2002) che in quelle degli strati basali e soprabasali dell'epitelio trasformato con un tipico pattern juxtannucleare dovuto alla sua localizzazione prevalentemente nell'apparato del Golgi (Borzacchiello et al., 2003; Roperto et al., 2012).

In vitro, infatti, è stato dimostrato che, grazie alla sua natura idrofobica, E5 si localizza a livello delle membrane del reticolo endoplasmatico (RE), e a livello dell'apparato del Golgi (AG) (Burkhardt et al., 1989; Pennie et al., 1993).

Secondo studi sperimentali recenti, E5 interagisce con la subunità c di 16KDa, una componente della pompa vacuolare H⁺-ATPase. Studi proteomici *in vivo* dimostrano, però, che la subunità principalmente coinvolta nella interazione E5/pompa ATPasica è la componente D della pompa stessa (Roperto et al., 2014). Normalmente, questa pompa acidifica il lume dei compartimenti intracellulari, compresi endosomi, lisosomi ed apparato del Golgi, siti di processazione dei fattori di crescita. Una conseguenza di tale interazione, è la mancata acidificazione dei suddetti compartimenti cellulari (Goldstein et al., 1991), la quale comporta una difficoltà ad esporre in superficie gli antigeni virali i quali persistono all'interno del citoplasma evitando i meccanismi difensivi dell'organismo.

E' stato, infatti, suggerito che le cellule neoplastiche possono sfuggire al controllo del sistema immunitario attraverso una down-regolazione mediata da E5 nei confronti del MHC classe I. Tale down-regolazione sembra essere correlata all'interazione tra E5 e la pompa adenosintrifosfatase, il che comporterebbe un'impropria glicosilazione e processazione delle molecole del complesso MHC di classe I (Marchetti et al., 2002).

E' stata dimostrata anche *in vivo* l'interazione tra E5 ed il recettore per il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF β -R) in forma fosforilata suggerendo non solo la funzionale attivazione del recettore su interazione con E5, ma anche l'importante ruolo di E5 nella trasformazione neoplastica delle cellule epiteliali e mesenchimali della vescica di grossi ruminanti (Borzacchiello et al., 2006; Roperto et al., 2013).

Anche l'attivazione delle proteine c-Src è stata dimostrata nella cancerogenesi epiteliale E5-dipendente (Suprynowicz et al., 2002; Borzacchiello et al., 2006, 2007).

Nuovi pathways molecolari, tuttavia, sono stati trovati nei tumori della vescica del bovino associati a BPV-2. E' stato dimostrato che il BPV-2 si rende responsabile dell'over-espressione del fattore di crescita E2F3 attraverso l'attivazione della forma proteolitica della Calpaina 3 (Capn 3). La Capn3 idrolizza il legame pRB/E2F3 rendendo libero il fattore di crescita E2F3 che induce, così, la proliferazione delle cellule uroteliali (Roperto et al., 2010; 2013).

Anche i papillomavirus umani down-regolano la pRb liberando i fattori di crescita della famiglia E2F con meccanismi diversi.

Infatti, l'E7 degli HPV ha un dominio con il quale lega la pRb determinandone la down regolazione attraverso la calpaina ubiquitaria I o μ -calpaina.

1.5 Obiettivi prefissati nel triennio di dottorato

Durante il corso dei tre anni di dottorato, ho frequentato il laboratorio di Patologia Generale del Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali, laboratorio in cui la biologia molecolare e la morfologia delle infezioni da Papillomavirus Bovini (Bovine Papillomavirus - BPVs) vengono studiate in gran dettaglio. In particolare, ho studiato alcuni meccanismi molecolari che possano migliorare le nostre conoscenze circa i pathways alla base della trasformazione neoplastica della cellula uroteliale.

In questi tre anni ho collaborato con il team del prof. Roperto e mi sono dedicata allo studio dell'espressione del recettore Mincle e dell'oncogene ERas.

Mincle, macrofage-inducibile C-type lectin (chiamato anche CLEC4E), è un membro della famiglia dei recettori lectinici di tipo C (CLR). È stato originariamente identificato come bersaglio trascrizionale di NF-interleuchina-6 (IL-6) ed è principalmente espresso sulle cellule professionali presentanti l'antigene (APC), macrofagi, cellule dendritiche (DC), cellule B e neutrofili (Matsumoto et al., 1999). Il livello di espressione del recettore mincle in condizioni normali è, generalmente, basso; tuttavia, è fortemente upregolato dopo esposizione a diversi segnali infiammatori (Miyake et al., 2010).

Mincle sembra essere selettivamente associato al recettore gamma Fc (FcγR) ed attiva i macrofagi a produrre citochine infiammatorie e chemochine (Yamasaki et al., 2008); rileva le cellule necrotiche attraverso il suo ligando primario SAP130 ed è, inoltre, un recettore chiave per il trehalose dimycolate, componente della parete dei micobatteri, (TDM) diventando così un importante modulatore dell'immunità antimicrobica (Ishikawa et al., 2009, Schoenen et al., 2010) ed antimicotica in quanto riconosce alcuni funghi patogeni come *Candida albicans*, specie *Malassezia* e *Fonsecaea pedrosoi*.

Recenti studi hanno, inoltre, dimostrato che il gene ERas, mediante la trasduzione del segnale attivata dal fosfatidilinositol-3 chinasi (PI3K) dalle proteine a valle (Akt), svolge un ruolo importante nel pathway molecolare che è alla base dello sviluppo della carcinogenesi uroteliale, promossa dall'oncoproteina E5 dei Deltapapillomavirus bovini, attraverso l'attivazione del PDGFβR (Corteggio et al., 2010).

L'oncogene ERas è un gene recentemente identificato nelle cellule staminali embrionali (ES) murine (Takahashi et al., 2003). Codifica per una proteina GTPasi, costitutivamente attiva, che si lega ed attiva la fosfatidilinositolo-3 chinasi (PI3K), che a sua volta fosforila ed attiva bersagli a valle, come Akt, promuovendo, in vitro, la proliferazione e la crescita tumorigenica di cellule embrionali staminali murine. ERas, a differenza degli oncogeni convenzionali della famiglia Ras, risulta costitutivamente attivo senza alcuna acquisizione di mutazioni puntiformi. Nonostante ci siano pochi e controversi studi in vitro e in vivo, si ritiene, che l'espressione di tale oncogene sia associata alla progressione, alla proliferazione e alla trasformazione neoplastica (Kaizaki et al., 2009, Kubota et al., 2010, Liu et al., 2013).

2. MATERIALI E METODI

Sono stati raccolti campioni di tumori della vescica, prelevati in pubblici macelli, da bovini regolarmente macellati nel contesto di un programma di ricerca sui tumori della vescica dei ruminanti che da vari anni si sta portando avanti nel settore di Patologia generale del Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali.

I soggetti, di età compresa tra 4 e 30 anni, clinicamente affetti da ematuria enzootica cronica (EEC), provenivano da allevamenti condotti allo stato brado e/o semibrado ubicati in diverse aree del Centro-Sud Italia, i cui pascoli risultano notoriamente ricchi di *Pteridium aquilinum*, sono stati raccolti anche campioni di vesciche provenienti da animali sani.

Ogni campione è stato diviso in più parti che sono state fissate in formalina al 10% ed in glutaraldeide al 4% in 0,1M buffer fosfato per le indagini istologiche ed ultrastrutturali e congelate in azoto liquido e/o conservate in RNA Later per le analisi di biologia molecolare.

La diagnosi istologica dei campioni di vescica bovina è stata effettuata mediante allestimento di sezioni in paraffina di circa 4 µm, colorate con ematossilina eosina (H&E), utilizzando sia la classificazione istologica dei tumori uroteliali del bovino suggerita in Medicina Veterinaria nel 2010 da Roperto et al sia i criteri morfologici suggeriti nel 2004 dal World Health Organization (WHO) Blue Book sulla patologia e la genetica dei tumori del sistema urinario dell'uomo e in accordo con i recenti studi sui tumori dei tessuti molli della vescica urinaria nell'uomo (Eble et al., 2004; Lott et al., 2007).

Sono state, inoltre, eseguite indagini biochimico-molecolari (Immunoprecipitazione e Western Blot, PCR, sequenziamento e RealTime PCR) e morfologiche mediante (immunoistochimica ed immunofluorescenza) ed infine sono stati effettuati studi ultrastrutturali per la presenza di particelle virali nei nuclei delle cellule infette.

2.1 Estrazione di RNA

L'RNA totale è stato estratto da campioni di vesciche urinarie di bovini utilizzando il kit RNeasy Mini (Qiagen, Milano, Italia). La quantità e il grado di purezza dell'RNA sono stati valutati utilizzando il NanoVue Plus e mediante elettroforesi su gel di agarosio all' 1%. Il DNA genomico è stato rimosso dalle preparazioni di RNA con RNase-free DNase I Fermentas Life Sciences (Dakit, Milano, Italia).

2.2 RT -PCR per BPV-2, BPV-13 E5, Mincle, FcγR e CXCL2

La reazione a catena della polimerasi con trascrittasi inversa (RT-PCR) viene utilizzata per amplificare DNA a partire da un pool di RNA di un tipo cellulare. La trascrizione inversa genera una copia del filamento di RNA sotto forma di filamento di DNA complementare (cDNA). Tale filamento costituisce il substrato per l'amplificazione nella PCR. La RT-PCR comprende due tappe fondamentali: la retrotrascrizione dell'RNA e l'amplificazione del cDNA ottenuto con la retrotrascrizione. Nella prima fase della trascrizione inversa, primers non specifici o "random examers", che consistono in piccoli oligonucleotidi, ibridizzano con l'RNA bersaglio e vengono estesi dall'enzima trascrittasi inversa dando origine a numerosi filamenti di cDNA.

Per la nostra sperimentazione, l'RNA totale è stato trascritto utilizzando il kit iScript cDNA Synthesis (Bio-Rad Laboratories, Milano, Italia) e la reazione è stata incubata a 25° C per 5 min, 42° C per 30 min, 85° C per 5 min, e poi mantenuta a 4° C per 5 min. Il cDNA è stato sintetizzato mediante PCR con primer specifici per BPV-2 E5 ORF (forward, 5'-CACTGCCATTTGTTTTTTTC-3', reverse, 5'-GGAGCACTCAAAATGATCCC-3'), per il BPV-13 E5 ORF (forward, 5'-CACTGCCATTTGGTGTTCCTT-3'; reverse, 5'-AGCAGTCAAAATGATCCCAA-3'), per il Mincle primer (forward, 5'-GACTGAGGGTCAGTGGCAAT-3', reverse, 5'-GTCCCTTATGGTGGCACAGT-3'), per FcγR (forward, 5'-TTTGGTTGAACAAGCAGCGG-3'; reverse, 5'-TGCAACTTGAGTCGGCAGTA-3') e per CXCL2 (forward, 5'-GCCGCTCCCATGGTTAAGAA-3'; reverse, 5'-TCTGTAGGGGCAGGGTCTAC -3').

Per valutare l'adeguatezza dei campioni di cDNA, è stata condotta in parallelo una PCR della β -actina, utilizzando un set di primer disegnati dal software BLAST Primer (forward, 5'-GAGCGTGGCTACAGCTTCAC-3'; reverse, 5'-CATTGCCGATGGTGATGA-3').

La RT-PCR è stata effettuata utilizzando una miscela di reazione di 25 microlitri contenente 2,5 microlitri di buffer 10 X, 2 mM di $MgCl_2$, 2.5 U di AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Life Technologies, Monza, Italia), 480 nM di ciascun primer e 200 mM di ogni dNTP ed estratto il DNA di 50 ng. Il programma di amplificazione utilizzato ha previsto un'iniziale denaturazione per 3 minuti a 95° C, seguita da 35 cicli di denaturazione per 30s a 95° C, "annealing" per 30s a 60° C e un'estensione per 1 minuto a 72° C. Un'ulteriore fase di estensione finale a 72° C per 7 minuti è stata eseguita in ciascun saggio PCR.

L' elettroforesi su gel di 20 microlitri di DNA amplificati ha mostrato un prodotto della dimensione attesa. In ciascun esperimento, è stato incluso un campione bianco costituito da una miscela di reazione senza DNA. Per entrambe le analisi sono stati utilizzati campioni positivi di BPV-2 clonato (gentile dono del Dr. A. Venuti) e un campione positivo di BPV-13 (gentile dono del Dr. A.A. Alfieri).

Il DNA amplificato è stato poi purificato attraverso le membrane silicagel utilizzando il kit di quantificazione QIAquick PCR secondo le istruzioni del produttore (Qiagen, Milano, Italia). I prodotti di RT-PCR, dopo la separazione mediante elettroforesi su gel, sono stati sequenziati usando un sequenziatore automatico in base al metodo Sanger (ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer, Life Technologies, Monza, Italia). Inoltre, il DNA di Mincle amplificato da vesciche sane e patologiche è stato clonato in pGEM-T vector utilizzando il pGEM-T Easy Vector System (Promega, Milano, Italia) e sequenziato nell'apposito strumento automatizzato (ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer, Life Technologies).

2.3 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) per Mincle

Per l'analisi quantitativa (qRT-PCR), sono stati retrotrascritti 500 ng di RNA utilizzando il kit iScript cDNA Synthesis (Bio-Rad Laboratories, Milano, Italia). La reazione è stata incubata a 25° C per 5 min, 42° C per 30 min, 85° C per 5 min, e poi conservata a 4° C per 5 minuti. La reazione è stata eseguita utilizzando il SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad

Laboratories, Milano, Italia). Per la rilevazione di Mincle sono stati utilizzati primers specifici (come descritto sopra). Tutte le reazioni sono state effettuate in triplice copia e la β -actina è stata usata come standard interno (forward primer 5'-TAGCACAGGCCTCTCGCCTTCG-3'; reverse 5'-GCACATGCCGGAGCCGTTGT-3').

2.4 Western blot per Mincle

Campioni di vesciche sane e tumorali sono stati solubilizzati per 2 ore a 4° C in tampone di lisi contenente 50 mM Tris-HCl pH 7,5, NaCl 150 mM, 1% Triton X-100. Immediatamente prima dell'uso, sono stati aggiunti i seguenti reagenti: 1 mM DTT, 2 mM PMSF, 1,7 mg / ml aprotinina, 25 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄ (Sigma-Aldrich, Milano, Italia).

I lisati sono stati centrifugati a 15000 rpm per 30 min. La concentrazione di proteine è stata misurata mediante il saggio di Bradford (Bio-Rad Laboratories, Milano, Italia). Per il Western blotting, 100 mg di proteine lisate sono state riscaldate a 100° C in 4X premiscelato di tampone Laemmli (Bio-Rad Laboratories, Milano, Italia). Le proteine sono state poi sottoposte a elettroforesi su gel di sodio dodecil solfato-poliacrilammide (SDS-PAGE) in condizioni riducenti.

Dopo l'elettroforesi, le proteine sono state trasferite su filtro di nitrocellulosa (GE Healthcare Life Sciences, Chalfont St Giles, Regno Unito) per 1 ora a 10 V a 192 glicina mm / 25 mM Tris-HCl (pH 7.5) / 10% di metanolo usando un Trans-Blot SD Semi Dry Cell (Bio-Rad Laboratories, Milano, Italia) secondo le istruzioni del produttore. Le membrane sono state bloccate con albumina siero bovino (BSA) al 5% in soluzione salina tamponata Tris (TBS, pH 7,5) per 1 ora a temperatura ambiente, e lavate con TBS-0.1% Tween. Poi, i filtri sono stati incubati con l'anticorpo anti-Mincle (CLEC4E) (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) diluito 1:1000 nel 5% BSA per una notte a 4° C. Dopo tre lavaggi in Tris, le membrane sono state incubate con un anticorpo IgG anti-capra coniugato con perossidasi (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) per 1 ora a temperatura ambiente. Dopo opportuni lavaggi, l'anticorpo legato è stato visualizzato da un sistema di chemiluminescenza (Western Blotting Luminol Reagent, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Le immagini sono state acquisite con il software Image Lab versione 2.0.1 (Bio-Rad Laboratories, Milano, Italia).

2.5 Immunoistochimica Mincle-Fc e RI γ -CARD9-Syk

Tutti i campioni, patologici e controllo, della mucosa della vescica urinaria sono stati testati in parallelo con il metodo ABC, complesso avidina-biotina-perossidasi, mediante il kit Vectastain ABC (Vector Laboratories, Inc., CA, USA). Le sezioni di paraffina sono state inizialmente sparaffinate in xilolo, idratate mediante una serie discendente di alcoli ed acqua distillata e poi sono state bloccate con la perossidasi endogena allo 0,3% H₂O₂ in metanolo per 20 min. Lo smascheramento antigenico è stato eseguito mediante pretrattamento con riscaldamento in forno a microonde (due volte per 5 minuti a 750 W) in tampone citrato (pH 6,0). I vetrini sono stati lavati tre volte con tampone fosfato salino (PBS), poi incubati per 1 ora a temperatura ambiente con siero normale di coniglio (Vector Laboratories Inc., CA, USA) diluito al 20%. Gli anticorpi primari utilizzati sono stati: polyclonal goat anti-CLEC 4E, anti-Fc e RI γ , anti-CARD9 e un mouse monoclonal anti-Syk (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA) diluiti, rispettivamente, 1:200, 1:400, 1:300 e 1:50, in tampone fosfato (PBS) e sono stati applicati sulle sezioni in camera umida a 4° C per una notte.

Il giorno seguente le sezioni sono state sottoposte a tre lavaggi con PBS, di 4 minuti ciascuno, ed incubate per 30 minuti a temperatura ambiente con gli appropriati anticorpi secondari biotinilati anti-capra (Vector Laboratories Inc., CA, USA) diluiti 1:200 in PBS. Le sezioni sono state lavate tre volte con PBS e quindi incubate con il reagente Vectastain ABC (Vector Laboratories Inc., CA, USA) in camera umida a temperatura ambiente per 30 minuti. La colorazione finale è stata ottenuta mediante applicazione della 3,3'-diaminobenzidina (Vector Laboratories Inc., CA, USA) sulle sezioni, per un tempo variabile da 2 a 10 min. Le sezioni sono state, infine, contrastate con ematossilina di Mayer, disidratate attraverso una serie ascendente di alcoli, chiarificate in xilolo e montate in Eukitt. L'anticorpo primario è stato omesso e sostituito da diluente nei controlli negativi in cui non è stata rilevata alcuna colorazione di fondo.

2.6 BPV-2 e BPV-13 rilevazione del DNA e sequenziamento

E' stata eseguita una PCR su campioni congelati di vesciche sane e patologiche per identificare il DNA del BPV-2 e del BPV-13, utilizzando il kit Tissue DNeasy (Qiagen). Campioni di vesciche di bovini sani sono state usate come controllo negativo. Tutti i

campioni sono stati lisati con proteinasi K. I lisati sono stati caricati su colonne di rotazione DNeasy. Dopo due lavaggi il DNA puro è stato eluito in un tampone di sale.

Per la rilevazione di BPV-2 DNA, sono stati progettati primer specifici per ampliconi di DNA di 503 bp che comprendono la sequenza di BPV-2 E5-L2 ORF (nt 3723-4225) dal software Primer BLAST (forward, 5'-TCAGGCACAGATCTTGATCA-3'; reverse, 5'-TCATAGACATTTGCACGTT-3'). Anche per la rilevazione di BPV-13 DNA sono stati progettati primer specifici per la BPV-13 E5 ORF da un software Primer BLAST. Un prodotto di 153 bp dal E5 ORF (nt 3852 \pm 3871, 5'-CACTGCCATTTGGTGTTCCTT-3'; nt 4004 \pm 3983, 5'-AGCAGTCAAAATGATCCCAA-3').

Per valutare l'adeguatezza del DNA, è stato utilizzato un controllo interno di β -actina bovino mediante PCR con un set di primer specifici (forward, 5'-GAGCGTGGCTACAGCTTCAC-3'; reverse, 5'-CATTGCCGATGGTGATGA-3').

La PCR è stata effettuata con una miscela di reazione di 25 μ L contenente 2,5 microlitri di buffer 10 X, 2 mM $MgCl_2$, 2,5 U di AmpliTaq DNA Polimerasi Gold (Applied Biosystems), 480 nM di ciascun primer e 200 mM di ciascun dNTP e 50 ng di DNA estratto. Le condizioni di reazione della PCR sono state le seguenti: denaturazione per 3 min a 95° C, seguita da 35 cicli di denaturazione a 95° C per 30s, annealing a 60° C per 30s per E5 BPV-13 e β -actina, oppure da 50° C per BPV-2, ed estensione a 72° C per 1 min. Un'ulteriore fase di estensione finale è stata eseguita a 72° C per 7 min in ciascun saggio PCR. L'Elettroforesi su gel di 20 microlitri di DNA amplificati ha dimostrato un prodotto della dimensione attesa. In ciascun esperimento, sono stati inclusi un campione bianco costituito da miscela di reazione senza DNA ed un campione BPV-2 positivo costituito da BPV-2 clonato (gentile dono del Dr. A. Venuti) e un campione positivo BPV-13 (gentile dono del Dr. A.A. Alfieri). Il DNA amplificato è stato purificato attraverso membrane silicagel utilizzando il kit di quantificazione QIAquick PCR secondo le istruzioni del produttore (Qiagen).

Il sequenziamento è stato effettuato utilizzando un sequenziatore automatico in base al metodo Sanger (ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems).

2.7 Estrazione dell'RNA e RT -PCR per BPV-2 e BPV-13 E5

L'RNA totale è stato estratto da campioni di vescica utilizzando il kit RNeasy Mini (Qiagen). La qualità dell'RNA è stata determinata mediante elettroforesi su gel di agarosio ed analisi spettrofotometrica ad ultravioletto. L'RNA è stato trattato con RNasi-free DNasi I Fermentas Life Technology (Dasit, Milano, Italia) per rimuovere eventuali contaminazioni da DNA. L'RNA totale è stato trascritto utilizzando il kit iScript cDNA Synthesis (Bio-Rad) e la reazione è stata incubata a 25° C per 5 min, 42° C per 30 min, 85° C per 5 min, e poi mantenuta a 4° C per 5 minuti. Il cDNA sintetizzato è stato analizzato mediante PCR con primer specifici per BPV-2 E5 ORF (forward, 5'-CACTGCCATTTGTTTTTTTC-3' reverse, 5'-GGAGCACTCAAATGATCCC-3') e BPV-13 E5 ORF (come descritto sopra). Il prodotto dell'RT-PCR è stato sequenziato dopo separazione mediante elettroforesi su gel.

2.8 Western blot per ERas-Akt-pAkt

Campioni di vesciche sane e patologiche sono stati solubilizzati a 4° C in tampone di lisi contenente 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, NaCl 150 mM, 1% Triton X-100. Immediatamente prima dell'uso, sono stati aggiunti i seguenti reagenti: 1 mM DTT, 2 mM PMSF, 1,7 mg / ml aprotinina, 25 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄ (Sigma-Aldrich, Milano, Italia). I lisati sono stati centrifugati a 500 × g per 20 minuti. La concentrazione di proteine è stata misurata usando il saggio di Bradford (Bio-Rad Laboratories, Milano, Italia). Per il Western blotting, sono stati riscaldati 50 mg di proteine lisate a 90° C in tampone premiscelato 4X Laemmli (Bio-Rad Laboratories, Milano, Italia). Le proteine sono state, poi, sottoposte a elettroforesi su gel di sodio dodecil solfato poliacrilammide (SDS-PAGE) in condizioni riducenti. Dopo l'elettroforesi, le proteine sono state trasferite su filtri di nitrocellulosa (GE Healthcare Life Sciences, Chalfont St Giles, Regno Unito) per 1 ora a 300 mA a 192 mm glicina / 25 mM Tris-HCl (pH 7.5) / 10% di metanolo con un Trans-Blot SD (Bio-Rad Laboratories, Milano, Italia) secondo le istruzioni del produttore. Le membrane sono state bloccate con latte disidratato al 5% in soluzione salina tamponata con Tris (TBS, pH 7,5) per 1 ora a temperatura ambiente e lavate con TBS-0.1% Tween. Poi, sono state incubate con filtri anti-ERas, anti-Akt e anti-pAkt (fosforilata a ser⁴⁷³), anticorpi beta-actina (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), per una notte a 4° C. Dopo tre lavaggi in soluzione salina

tamponata con Tris, le membrane sono state incubate con IgG coniugato con perossidasi di rafano anti-coniglio (Bio-Rad Laboratories, Milano, Italia) per 1 ora a temperatura ambiente. Dopo opportune fasi di lavaggio, gli anticorpi coniugati sono stati visualizzati da un sistema di chemiluminescenza potenziata (Western Blotting Luminol reagente, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Le immagini sono state acquisite con il software Image Lab versione 2.0.1 (Bio-Rad).

2.9 ERas RNA rilevamento e sequenziamento

L'RNA totale è stato estratto da campioni di vesciche utilizzando l'RNeasy Mini Kit (Qiagen TM, Germania). La qualità dell'RNA è stata determinata mediante elettroforesi su gel di agarosio e analisi spettrofotometriche ad ultravioletto. L'RNA è stato trattato con RNasi-free DNasi I Fermentas Life Technology (Dasit, Milano, Italia) in modo da rimuovere eventuali contaminazioni da DNA. L'RNA totale è stato trascritto utilizzando il kit iScript cDNA Synthesis (Bio-Rad, Milano, Italia) e la reazione è stata incubata a 25° C per 5 min, 42° C per 30 min, 85° C per 5 min, e poi mantenuta a 4° C per 5 min.

Il cDNA sintetizzato è stato analizzato mediante PCR in triplicato. Sono stati utilizzati i seguenti primer per ERas bovino: forward, 5'-CCATGGCACAGCCAACAAAG-3' (nt 1.442 ± 1.462); reverse, 5'-CACCACCACTGCCTTGTACT-3' (nt 1568 ± 1588).

Aliquote di 50 ng di cDNA sono stati amplificati in 25 µl di miscela di reazione contenente 2 mM MgCl₂, 200 mM dNTP ciascuna, 480 nM di ciascun primer e 2,5 U di AmpliTaq Gold Polimerasi DNA (Applied Biosystems, Monza, Italia). La reazione è stata condotta in un termociclatore (Veriti, Applied Biosystems) con una denaturazione iniziale a 95° C per 3 min. Poi, sono state eseguiti 35 cicli di amplificazione con una fase di denaturazione a 94° C per 40 sec, una fase di annealing a 60° C per 40 sec, ed una fase di estensione a 72° C per 1 min. Un'ulteriore fase di estensione finale a 72° C per 7 minuti è stata eseguita in ciascun saggio PCR. I prodotti amplificati sono stati identificati mediante elettroforesi su gel di agarosio. In ciascun esperimento, è stato incluso un campione bianco costituito da miscela di reazione senza DNA. Il DNA amplificato è stato sottoposto a sequenziamento diretto in un apparato automatizzato (ABI Prism 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems).

2.10 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) per ERas

Le reazioni sono state eseguite utilizzando SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad Laboratories, Milano, Italia). Per l'analisi di quantificazione sono stati utilizzati primer specifici per ERas, come riportato sopra. Tutte le reazioni sono state eseguite in triplicato ed è stata usata la beta-actina come standard interno. I primer utilizzati sono i seguenti: forward, 5'-CCATGGCACAGCCAACAAAG-3'; reverse, 5'CACCACCACTGCCTTGTACT-3'.

2.11 ERas e PDGF β R Immunoprecipitazione

I tessuti sono stati lisati in tampone ghiacciato contenente 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% (v / v) Triton X-100, 150 mM NaCl, 2 mM PMSF, 1,7 mg / ml aprotinina, 50 mM NaF, e 1 mM sodio ortovanadato. La concentrazione di proteine è stata misurata mediante il saggio di Bradford (Bio-Rad Laboratories, Milano, Italia). Le proteine (1000 mcg) sono state immunoprecipitate con 2 mg di anticorpo anti-ERas (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) e 30 ml di Proteina A/G-Plus Agarose (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). I campioni immunoprecipitati sono stati lavati quattro volte in tampone di lisi completo ed infine riscaldati in tampone 1X Laemmli a 90° C per 10 minuti. Sono stati, poi, separati su gel di poliacrilammide e trasferiti su membrane di nitrocellulosa (filtri Ge Healthcare Life Sciences, Chalfont St Giles, UK) per 1 ora a 300 mA in 192 mM glicina / 25 mM Tris-HCl (pH 7,5) / 10% metanolo. Le membrane sono state bloccate per 1 ora a temperatura ambiente nel latte disidratato al 5%, e incubate con anticorpi anti-PDGF β R ed anticorpi anti-pPDGF β R (fosforilata in Tyr⁷⁷⁰) (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) per una notte a 4° C. Dopo tre lavaggi in soluzione salina tamponata con Tris, le membrane sono state incubate con IgG di capra anti-coniglio (Bio-Rad Laboratories, Milano, Italia) per 60 min a temperatura ambiente. Le proteine sono state visualizzate dal sistema chemiluminescenza (Western Blotting Luminol reagente, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) e XRS ChemiDoc più (Bio-Rad). Le immagini sono state acquisite con il software Image Lab versione 2.0.1 (Bio-Rad).

2.12 Immunoistochimica ERas

Tutti i campioni, patologici e controllo, della mucosa della vescica urinaria sono stati testati in parallelo. Le sezioni di paraffina sono state inizialmente sparaffinate in xilolo, idratate, mediante una serie discendente di alcoli ed acqua distillata e poi bloccate con la perossidasi endogena allo 0,3% H_2O_2 in metanolo per 20 min. E' stato eseguito lo smascheramento antigenico mediante pretrattamento con riscaldamento in forno a microonde (due volte per 5 minuti a 750 W) in tampone citrato (pH 7,4). I vetrini sono stati lavati tre volte con tampone fosfato salino (PBS), poi incubati per 1 ora a temperatura ambiente con protein block (DakoCytomation, Denmark) privo di siero. L' anticorpo primario polyclonal rabbit anti-ERas (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA) diluito 1:50 in tampone fosfato (PBS) è stato applicato per una notte in una camera umida a 4° C. Il giorno seguente i vetrini sono stati lavati tre volte con PBS, poi incubati per 30 minuti con anticorpo secondario biotinilato appropriato (streptavidina-biotina (LSAB) Kit; DakoCytomation, Denmark). Le sezioni sono state, successivamente, lavate tre volte con PBS e poi incubate con streptavidina coniugata con perossidasi di rafano (LSAB Kit; DakoCytomation, Denmark). La colorazione finale è stata ottenuta mediante applicazione della 3,3'-diaminobenzidina (DakoCytomation, Denmark) sulle sezioni, per un tempo variabile da 5 a 20 min. Le sezioni sono state, infine, contrastate con ematossilina di Mayer, disidratate attraverso una serie ascendente di alcoli, chiarificate in xilolo e montate in Eukitt. L'anticorpo primario è stato omesso e sostituito da diluente nei controlli negativi in cui non è stata rilevata alcuna colorazione di fondo.

2.13 Immunofluorescenza

Per tutti i campioni, patologici e controllo, della mucosa della vescica urinaria sono state eseguite in parallelo le seguenti colocalizzazioni. Le sezioni sono state, inizialmente, sparaffinate, reidratate e pretrattate in un forno a microonde in tampone citrato (due volte per 5 minuti ciascuno a 750 W) per consentire lo smascheramento antigenico. Sono state, successivamente, lavate in PBS, pre-incubate per 1 ora con siero normale di asino diluito 1:20 e poi incubate con l'anticorpo primario polyclonal sheep anti-BPV-2 E5 diluito 1:500 in

tampone fosfato salino (PBS, pH 7,4, 0,01 M) (gentile concessione del Prof. L. Nasir, Università di Glasgow) e l'anticorpo primario polyclonal rabbit anti-ERas (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA) diluito in 1:25 in tampone fosfato salino (PBS, pH 7,4, 0,01 M) per una notte a 4° C in una camera umida.

Il giorno successivo, tutti i vetrini sono stati lavati per 20 min con PBS. Sono stati applicati un anticorpo secondario Alexa Fluor 488 donkey anti-sheep (Invitrogen, Molecular Probes) e un anticorpo secondario Alexa Fluor 546 goat anti-rabbit (Invitrogen, Molecular Probes), diluiti 1:50 in PBS, per 2 ore a temperatura ambiente. I vetrini, dopo 3 lavaggi con PBS, sono stati montati con un mezzo acquoso (Sigma-Aldrich, Milano, Italia).

Per la colocalizzazione di BPV-2 E5 e pPDGFβR, le sezioni sono state trattate come sopra, e pre-incubate per 1 ora con siero normale di asino diluito 1:20. Gli anticorpi primari polyclonal sheep anti- BPV-2 E5 diluito 1:500 in tampone fosfato salino (PBS, pH 7,4, 0,01 M), e l'anticorpo primario polyclonal goat anti-pPDGFβR (fosforilata a Tyr⁷⁷⁰) (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA) diluito 1:25 in tampone fosfato salino (PBS, pH 7,4, 0,01 M) sono stati applicati per una notte a 4° C in una camera umida.

Il giorno successivo tutti i vetrini sono stati lavati per 20 min con PBS. Sono stati applicati un anticorpo secondario Alexa Fluor 488 donkey anti-sheep (Invitrogen, Molecular Probes) e un anticorpo secondario Alexa Fluor 546 donkey anti-goat (Invitrogen, Molecular Probes), diluiti 1:50 in PBS, per 2 ore a temperatura ambiente.

I vetrini, dopo 3 lavaggi con PBS, sono stati montati con un mezzo acquoso (Sigma-Aldrich, Milano, Italia).

Infine per la colocalizzazione di ERas e pPDGFβR (fosforilata a Tyr⁷⁷⁰), le sezioni sono state trattate come sopra e pre-incubate con siero normale di capra diluito 1:50. Gli anticorpi primari polyclonal rabbit anti-ERas (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA) diluito 1:25 in tampone fosfato salino (PBS, pH 7,4, 0,01 M) e l'anticorpo primario polyclonal goat anti-pPDGFβR (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA) diluito 1:25 in tampone fosfato salino (PBS, pH 7,4, 0,01 M) sono stati applicati per una notte a 4° C in una camera umida. Il giorno successivo tutti i vetrini sono stati lavati per 20 minuti con PBS. Sono stati applicati un anticorpo secondario Alexa Fluor 546 goat anti-rabbit (Invitrogen, Molecular Probes) e un anticorpo secondario Alexa Fluor 488 donkey anti-goat (Invitrogen, Molecular

Probes), diluiti 1:50 in PBS, per 2 ore a temperatura ambiente. I vetrini, dopo 3 lavaggi con PBS, sono stati montati con un mezzo acquoso (Sigma-Aldrich, Milano, Italia). Per tutte le osservazioni di immunofluorescenza è stato utilizzato un confocale a scansione laser LSM-microscopio a 510 (Zeiss, Göttingen, Germania).

Negli studi statistici sono stati considerati statisticamente significativi tutti i risultati con un $p \text{ value} \leq 0.05$.

3. RISULTATI

Nel corso dei tre anni di dottorato sono stati ottenuti interessanti risultati sulla biologia del BPV-2 e del BPV-13 che si compendiano nei seguenti lavori già pubblicati su riviste internazionali con riconosciuto “impact factor” ed altri in corso di pubblicazione.

3.1 Mincle, an innate immune receptor, is expressed in urothelial cancer cells of papillomavirus-associated urothelial tumors of cattle. PLoS One, 2015 Oct 29;10(10):e0141624. doi: 10.1371/journal.pone.0141624.

In questo lavoro è stata studiata, per la prima volta in oncologia veterinaria, l'espressione del recettore Mincle in cellule tumorali uroteliali di bovini affetti da tumori uroteliali associati a Papillomavirus.

Poiché' è stato dimostrato che le cellule tumorali uroteliali hanno la capacità di funzionare come cellule presentanti l'antigene (APC), si ritiene che anche l'espressione di mincle è coinvolta nella presentazione di antigeni di cellule tumorali alle cellule del sistema immunitario. Inoltre, poiché l'espressione di mincle contribuisce al controllo dell'infezione da *Mycobacterium bovis* (Behler et al., 2015), questo studio mostra interessanti implicazioni cliniche in medicina comparativa tenendo presente che l'immunoterapia con il *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) è attualmente il più efficace trattamento per i tumori uroteliali, non-invasivo della vescica nell'uomo.

Pertanto, le cellule tumorali della vescica potrebbero avere un ruolo nella rilevazione iniziale e nel trattamento con il BCG che porta al reclutamento del sistema immunitario e il recettore mincle possa avere un ruolo cruciale nel riconoscimento e nella internalizzazione del BCG. L'espressione di mincle in cellule uroteliali tumorali fornisce ulteriori informazioni per comprendere meglio il ruolo di questo recettore nel tumore della vescica.

La presenza della proteina mincle è stata riscontrata nei campioni patologici anche mediante Western Blot (Fig. 5), mentre è stato confermato un aumento statisticamente significativo dell'mRNA mediante RT-PCR (Fig. 6).

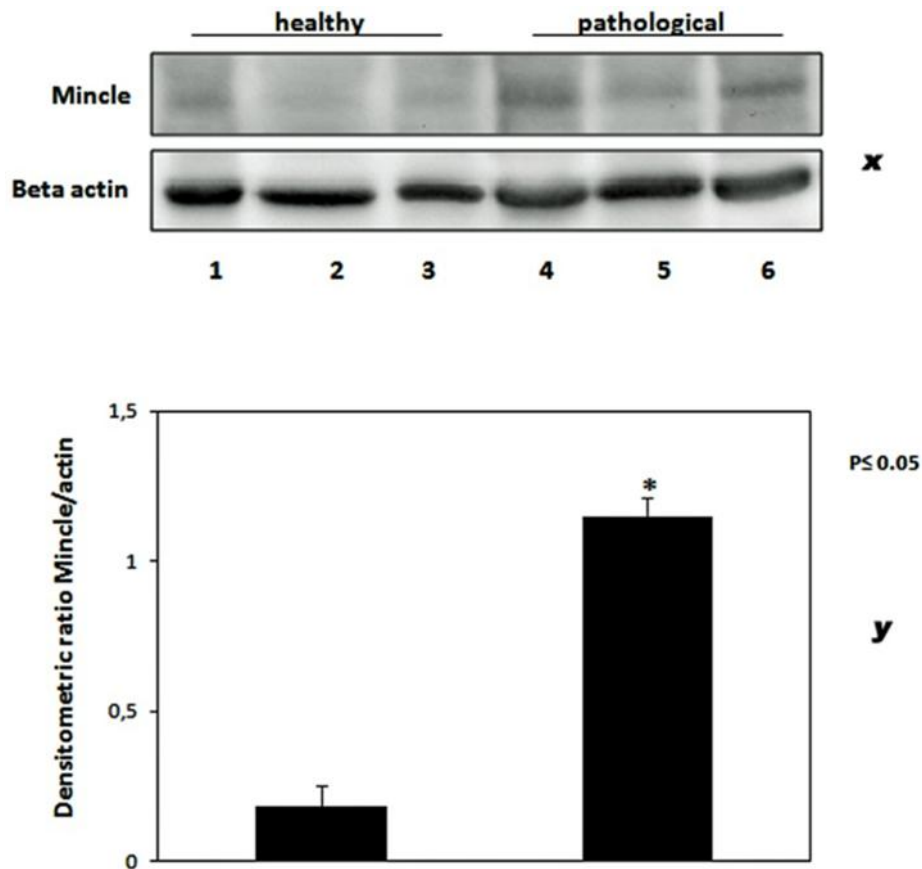


Fig. 5. **Espressione della proteina Mincle.** (x) L'analisi di **Western blot** mostra una overespressione statisticamente significativa della proteina mincle in campioni di vesciche tumorali. Linee 1–3: campioni di vescica urinaria di bovini sani. Linee 4–6: campioni di bovini con tumori della vescica associati a papillomavirus. I livelli di espressione dell'actina sono stati analizzati per la normalizzazione. (y) L'analisi densitometrica è stata effettuata con il software Image Lab (ChemiDoc; Bio - Rad Laboratories) e la significatività è stata determinata mediante il test T di Student (*, $p \leq 0.05$).

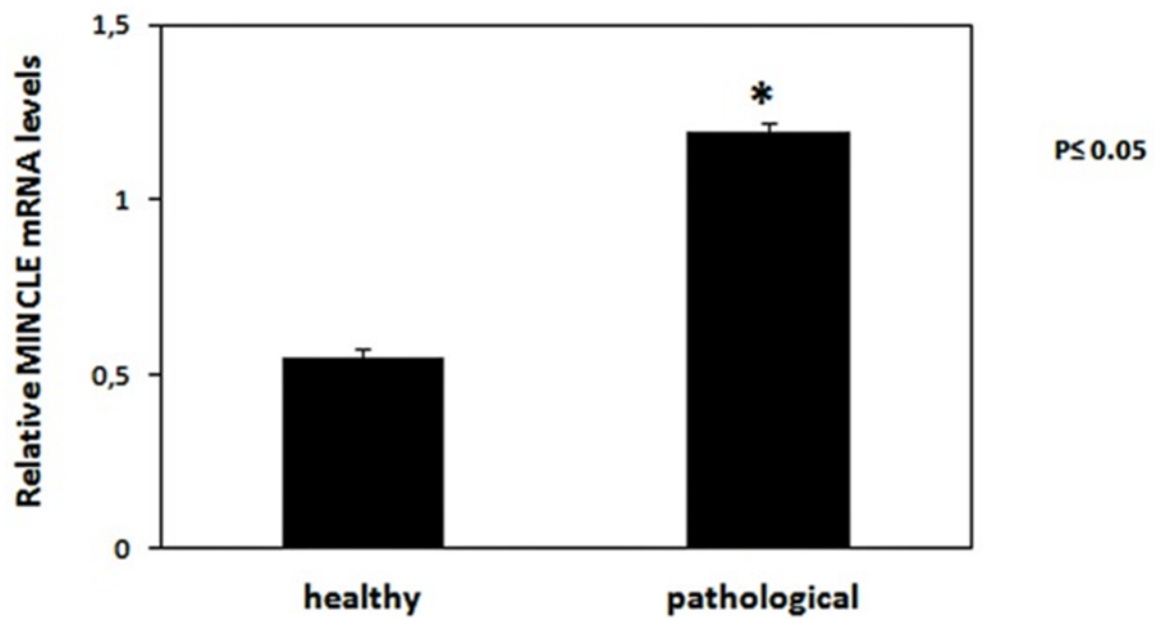


Fig. 6. **RT-PCR per Mincle.** I livelli di espressione dell'mRNA del mincle nei tessuti neoplastici sono stati calcolati con il metodo $\Delta\Delta CT$, e sono stati comparati con quelli dei tessuti di vescica sana. I valori sono stati normalizzati valutando l'espressione del gene housekeeping della β actina. I risultati rappresentano le medie e le deviazioni standard di tre esperimenti eseguiti in triplicato. (*, $p \leq 0.05$, vs vescica urinaria di animali sani).

La clonazione e l'ulteriore amplificazione dell'amplicone hanno mostrato una fortissima omologia con la sequenza del gene mincle bovino (fino al 99%), (Bos Taurus), depositata in GenBank (numero di adesione XM_010827920.1) (Fig. 7).

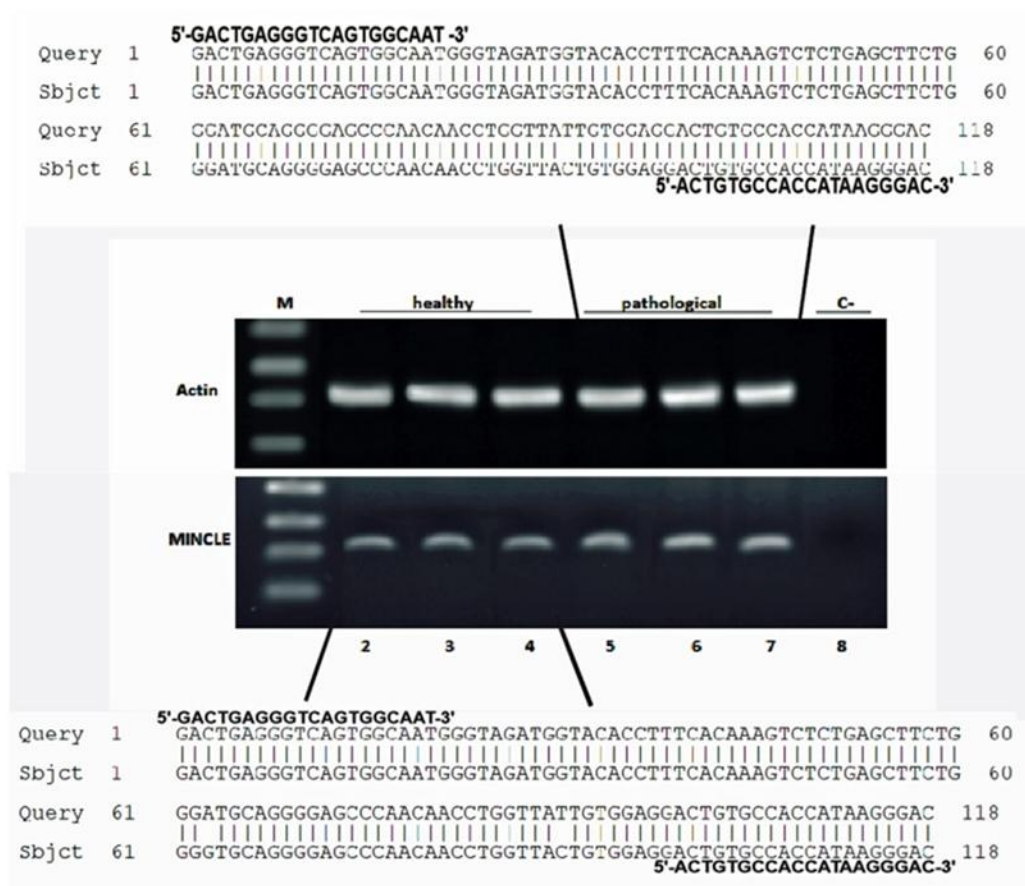


Fig. 7. **Sequenziamento del Mincle cDNA dopo clonazione.** Corsia M: indicatore di massa molecolare (DNA Ladder 1 kb, Microtech). Linee 2-4: campioni controllo provenienti da bovini sani. Linee 5-7: campioni di vesciche tumorali. Linea 8: controllo negativo (senza DNA aggiunto). Le parti superiore ed inferiore della figura mostrano una omologia del 99%, tra la sequenza degli ampliconi, dopo la clonazione e la sequenza di mincle bovino depositata in GenBank (numero di accesso: XM_010827920.1).

Indagini immunoistochimiche hanno, inoltre, confermato l'espressione del mincle, rispettivamente, di membrana nelle cellule dell'urotelio di tumori uroteliali papillari e citoplasmatica, nei tumori uroteliali invasivi (Fig. 8; Fig. 9). Non è stata rilevata, invece, alcuna espressione nelle cellule uroteliali normali, il che potrebbe significare che il livello di espressione di mincle è così basso in condizioni normali da non poter essere rilevato mediante procedure di immunoistochimica. Non è da escludere che il mincle rilevato in campioni di vesciche sane provenga da gruppi di cellule linfoidi e macrofagi che di solito sono presenti nella parete della vescica di bovini sani.

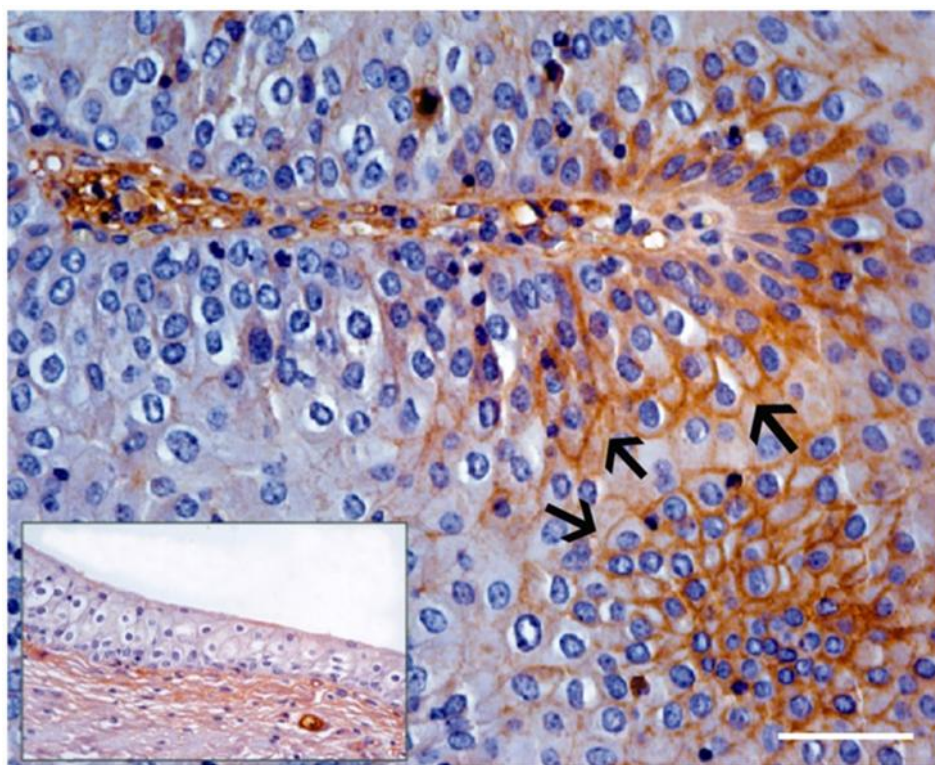


Fig. 8. **Tumore uroteliale papillare.** Pattern membranoso evidenziato con l'immunoistochimica in un tumore uroteliale papillare (freccce). Nel riquadro: non è stata osservata immunoreattività in cellule uroteliali normali. Ingrandimento, 40X.

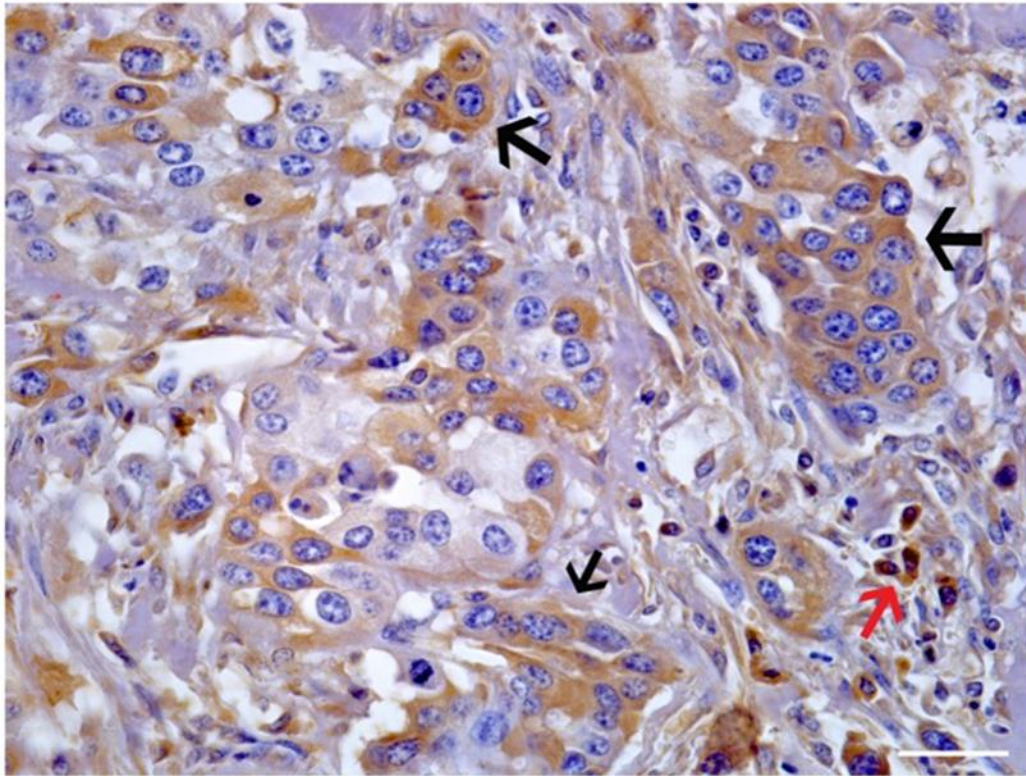


Fig. 9. **Tumore uroteliale invasivo.** Cluster di cellule neoplastiche mostra una forte immunoreattività citoplasmatica per mincle (freccie nere). Isolate cellule neoplastiche immunoreattive sono presenti nella parete vescicale. Immunoreattività evidente anche nei macrofagi associati al tumore (TAMs) (freccia rossa). Ingrandimento, 40X.

È noto che mincle si associa con la proteina adattatore FcγR, necessaria per l'attivazione del segnale, legandosi al Syk, proteina chinasi, che, a sua volta, attiva una cascata di segnali attraverso CARD9, proteina adattatore. Questo evento comporta l'induzione di citochine e chemochine come CXCL2. Pertanto, abbiamo studiato mediante RT-PCR l'espressione dell'mRNA di FcγR sia in campioni normali che patologici della vescica (Fig. 10).

L'analisi effettuata ha rivelato che le sequenze degli ampliconi mostrano una omologia del 97% con le sequenze del gene FcγRI bovino (*Bos taurus*) depositato in GenBank (numero di adesione AF316499.1).

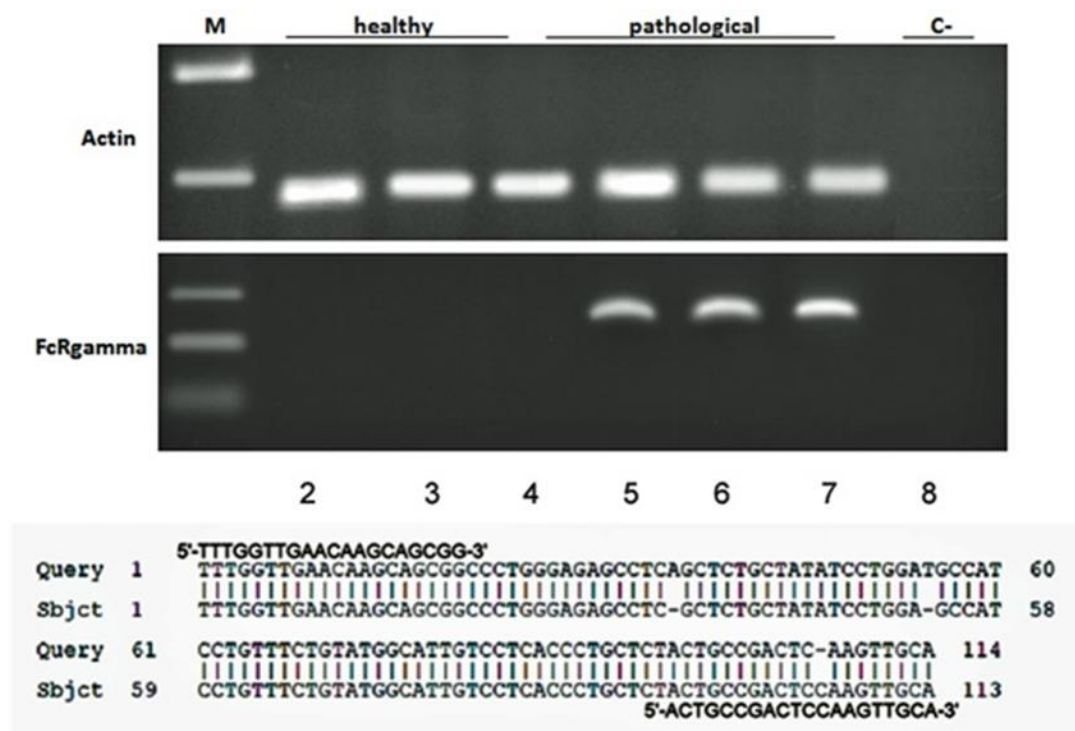


Fig. 10. **Espressione e sequenziamento di FcγR.** RT-PCR per FcγR. Corsia M: marcatore molecolare (HyperLadder II Bioline). Linee 2-4: campioni di vescica urinaria sani. Linee 5-7: campioni di vesciche tumorali. Linea 8: controllo negativo (senza DNA aggiunto). La parte inferiore della figura mostra una identità del 97% tra le sequenze degli ampliconi e le sequenze del gene FcγR1 bovino (*Bos taurus*) depositato in GenBank (numero di accesso: AF316499.1).

Morfologicamente, una forte immunoreattività citoplasmatica e di membrana è stata osservata come espressione aberrante di FcγRI nelle cellule tumorali uroteliali (Fig. 11).

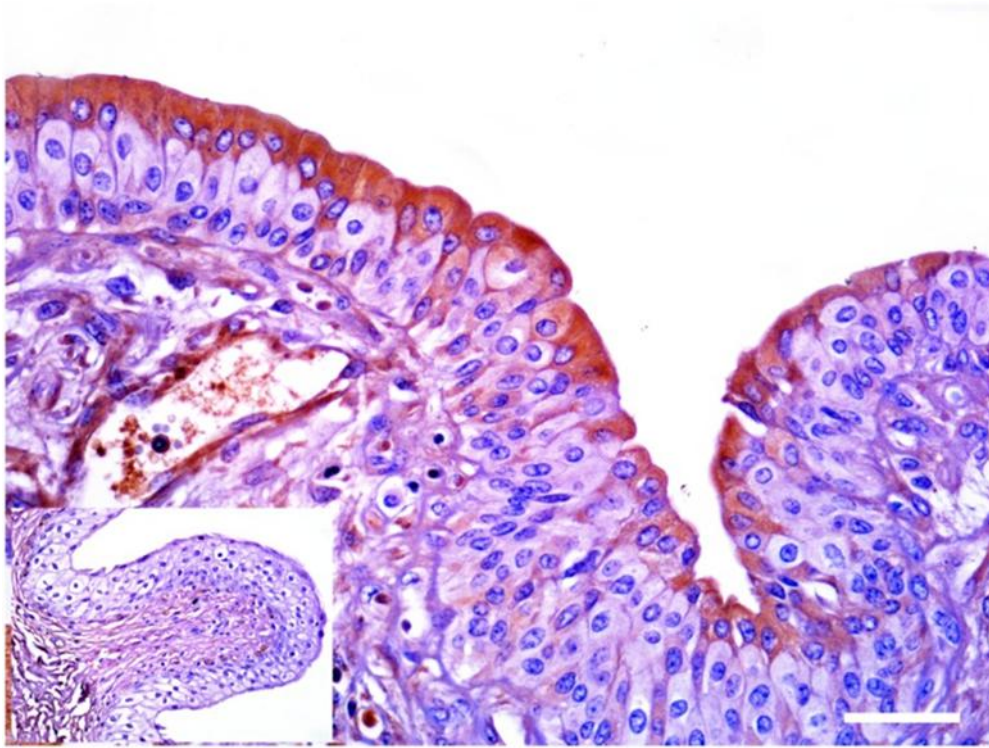


Fig. 11. **IHC FcγR**. Una forte immunoreattività citoplasmatica e di membrana mostra l'espressione aberrante di FcγRI nelle cellule tumorali uroteliali. Nel riquadro: non è stata osservata immunoreattività in cellule uroteliali normali. Ingrandimento, 40X.

Abbiamo inoltre studiato l'espressione morfologica dell'asse Syk-CARD nelle cellule uroteliali di campioni sani e neoplastici. Una elevata espressione di Syk è stata chiaramente individuata solo nelle cellule tumorali uroteliali (Fig. 12).

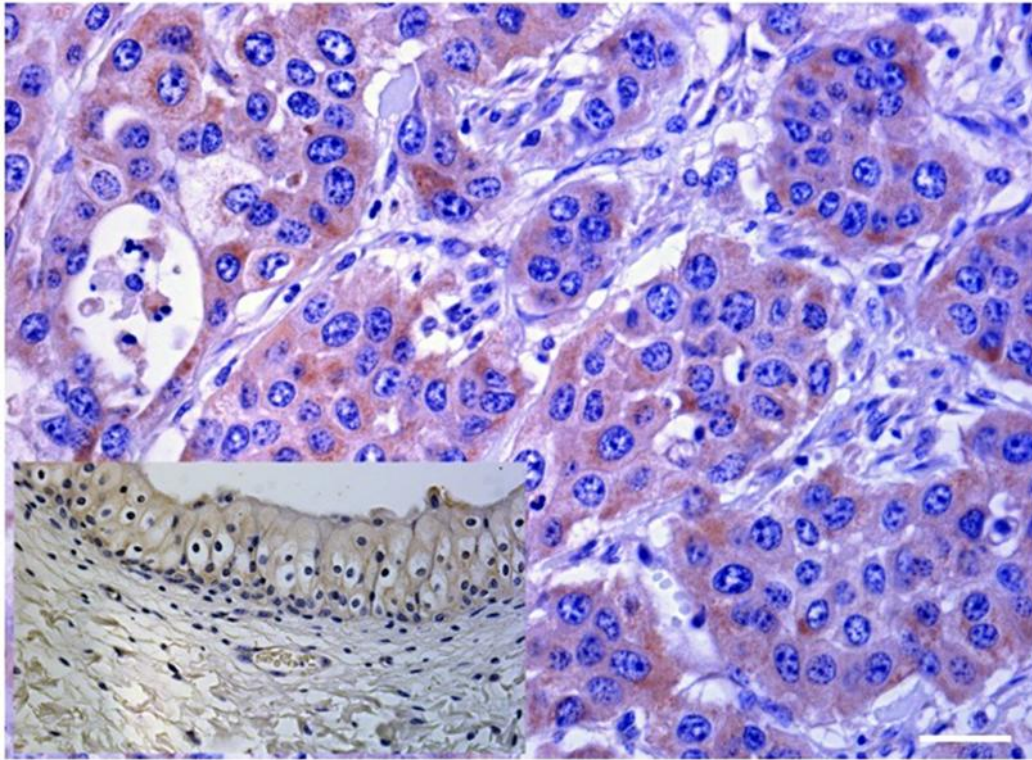


Fig. 12. **IHC Syk.** Una forte immunoreattività mostra l'espressione di Syk nelle cellule tumorali uroteliali. Nel riquadro: nessuna immunoreattività in cellule uroteliali normali. Ingrandimento, 40X.

Anche l'espressione della proteina CARD9 è stata evidenziata mediante immunoistochimica nelle cellule tumorali uroteliali patologiche. Non è stata rilevata, invece, alcuna espressione nelle cellule uroteliali di campioni sani (Fig. 13).

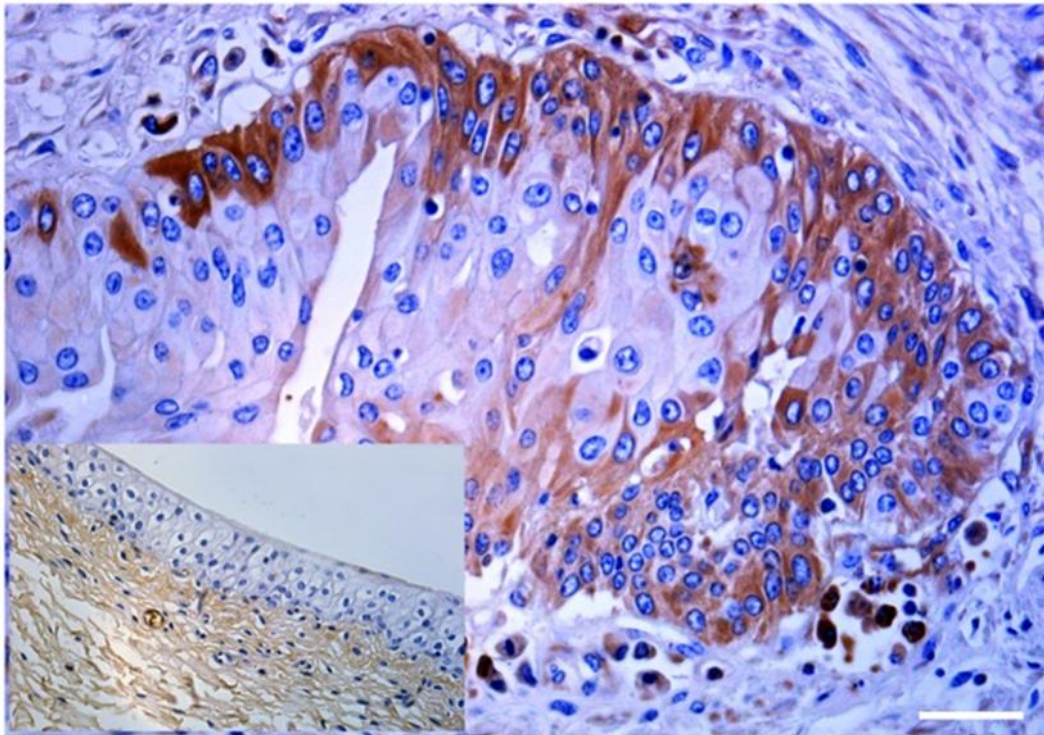


Fig. 13. **IHC CARD9**. Una chiara espressione di CARD9 nelle cellule tumorali uroteliali è documentata dalla forte immunoreattività citoplasmatica. Nel riquadro: nessuna immunoreattività in cellule uroteliali normali. Ingrandimento, 40X.

Infine abbiamo studiato l'espressione dell'mRNA di CXCL2, una chemochina pro-infiammatoria, mediante RT-PCR, ed abbiamo dimostrato la presenza del cDNA solo nei campioni tumorali; sequenze ottenute dagli ampliconi hanno confermato di essere trascritti CXCL2 in quanto hanno mostrato una omologia del 98% con la sequenza del gene CXCL2 bovino (*Bos taurus*), depositata in GenBank (numero di adesione NM_174299.3) (Fig. 14).

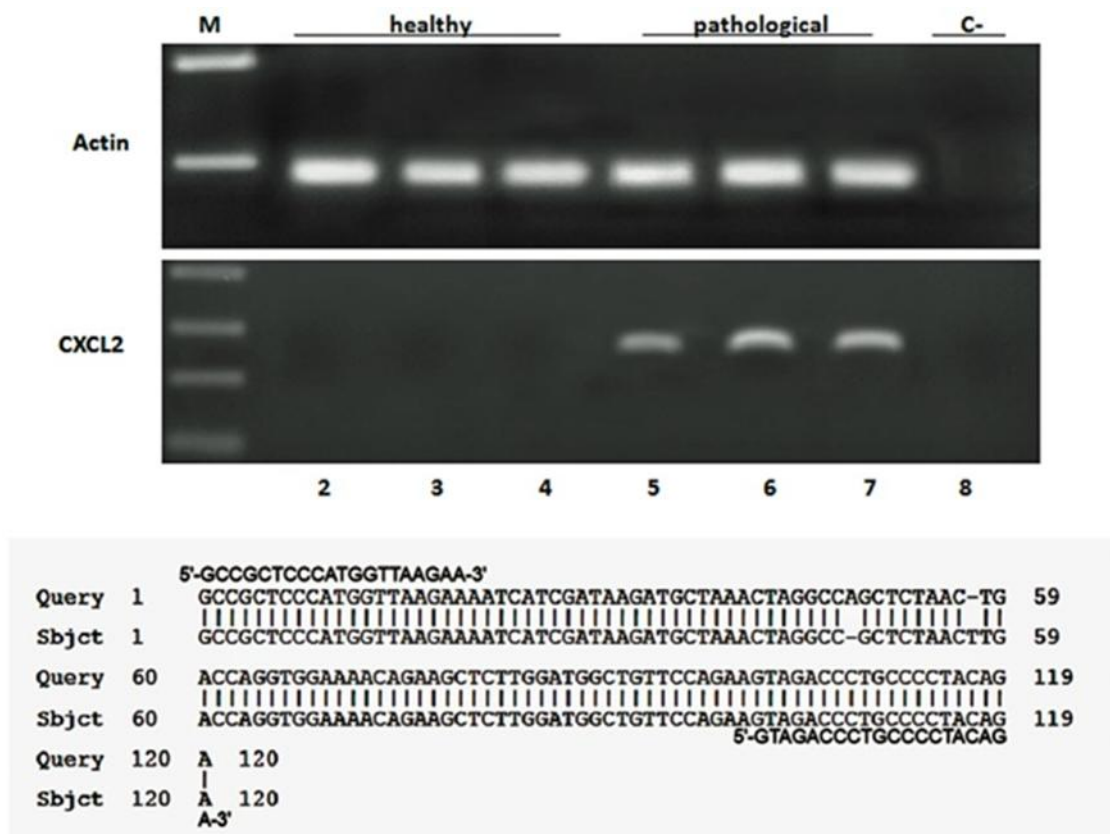


Fig. 14. **Espressione e sequenziamento di CXCL2.** RT-PCR per CXCL2. Corsia M: marcatore molecolare (HyperLadder II Bioline). Linee 2-4: campioni di vescica urinaria sani. Linee 5-7: campioni di vesciche tumorali. Linea 8: controllo negativo (senza DNA aggiunto). La parte inferiore della figura mostra una identità del 98% tra le sequenze degli ampliconi e le sequenze del gene CXCR2 bovino (*Bos taurus*) depositato in GenBank (numero di accesso: NM_174299.3).

Si ipotizza che l'espressione del mincle possa essere attivata da alcuni ligandi endogeni, ancora da identificare (Suzuki et al., 2013) e che tale recettore possa essere coinvolto nell'induzione di una risposta pro-infiammatoria in seguito allo stimolo di alcuni componenti rilasciati dalle cellule necrotiche. Studi futuri potranno fornire ulteriori approfondimenti sul ruolo del recettore mincle nelle cellule tumorali uroteliali e nella immunoterapia antitumorale.

3.2 ERas protein is overexpressed and binds to the activated platelet-derived growth factor β receptor in bovine urothelial tumour cells associated with papillomavirus infection. The Veterinary Journal, 2016, accepted and in press.

In questo lavoro abbiamo valutato, per la prima volta, in *vivo*, l'espressione del gene ERas in oncologia veterinaria comparata.

Abbiamo evidenziato che l'ERas è un gene funzionale nelle cellule somatiche della specie bovina. Infatti, sia nelle cellule tumorali che in quelle normali le indagini di RT-PCR hanno mostrato la presenza di trascritti, mentre il sequenziamento ha rilevato che la forma attiva di ERas è costitutivamente espressa in cellule uroteliali di bovini, ed è codificata come una proteina funzionale ben conservata.

È stato evidenziato che la localizzazione di membrana di ERas è essenziale per l'attivazione del pathway PI3K corroborando il dato che il motivo aminoacidico CSVA sia responsabile di questa localizzazione (Takahashi et al., 2005). In questo studio abbiamo, inoltre, dimostrato che il gene ERas è upregolato e codifica per una proteina che sembra essere overespressa nelle cellule tumorali.

È stato recentemente evidenziato che il pathway PI3K / AKT viene attivato a valle tramite la fosforilazione del PDGF β R in tumori uroteliali di bovini, papillomavirus-associati (Corteggio et al., 2013).

Si ritiene, quindi, che la proteina ERas sia un partner del PDGF β R fosforilato nelle cellule uroteliali del bovino. Pertanto, suggeriamo che la proteina ERas contribuisce all'attivazione del pathway molecolare PI3K / AKT nei tumori uroteliali di bovini e potrebbe essere coinvolta nella trasformazione cellulare in associazione con il PDGF β R, a sua volta attivato dall' oncoproteina E5 del papillomavirus. E ' noto, inoltre, che il segnale di AKT-PDGF β R (attivato) si verifica anche nella cancerogenesi del cervello umano favorendo la cancerogenesi del glioma (Zhang et al., 2014).

Pertanto, ERas sembra svolgere un ruolo importante nel pathway molecolare del tumore che porta alla carcinogenesi vescicale dei bovini.

Le indagini di Western Blot hanno rivelato la presenza della proteina ERas sia in campioni uroteliali di vescica sani che patologici (Fig. 15).

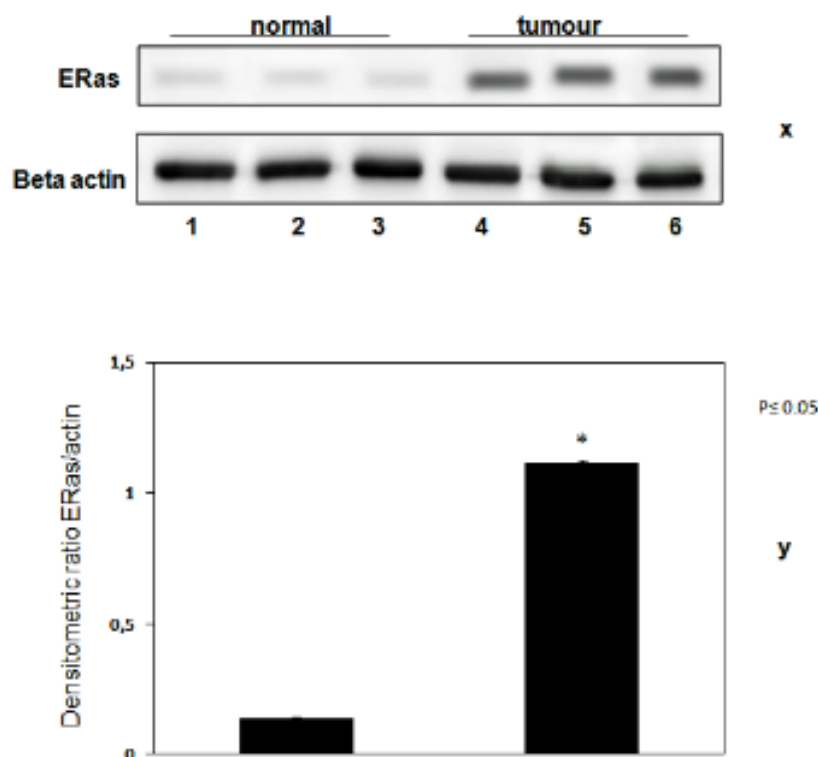


Fig. 15. **Espressione della proteina ERas.** (x) L'analisi di **Western Blot** mostra una overespressione statisticamente significativa della proteina ERas in campioni di vesciche tumorali. Linee 1-3: campioni di vescica urinaria di animali sani. Linee 4-6: campioni di bovini con tumori della vescica associati a papillomavirus. I livelli di espressione dell'actina sono stati analizzati per la normalizzazione. (y) L'analisi densitometrica è stata effettuata con il software Image Lab (ChemiDoc; Bio - Rad Laboratories) e la significatività è stata determinata mediante il test T di Student (*, $p \leq 0.05$).

Tuttavia, la proteina ERas risulta essere overespressa in cellule tumorali. La overespressione è stata documentata anche morfologicamente mediante indagini di immunoistochimica (Fig. 16).

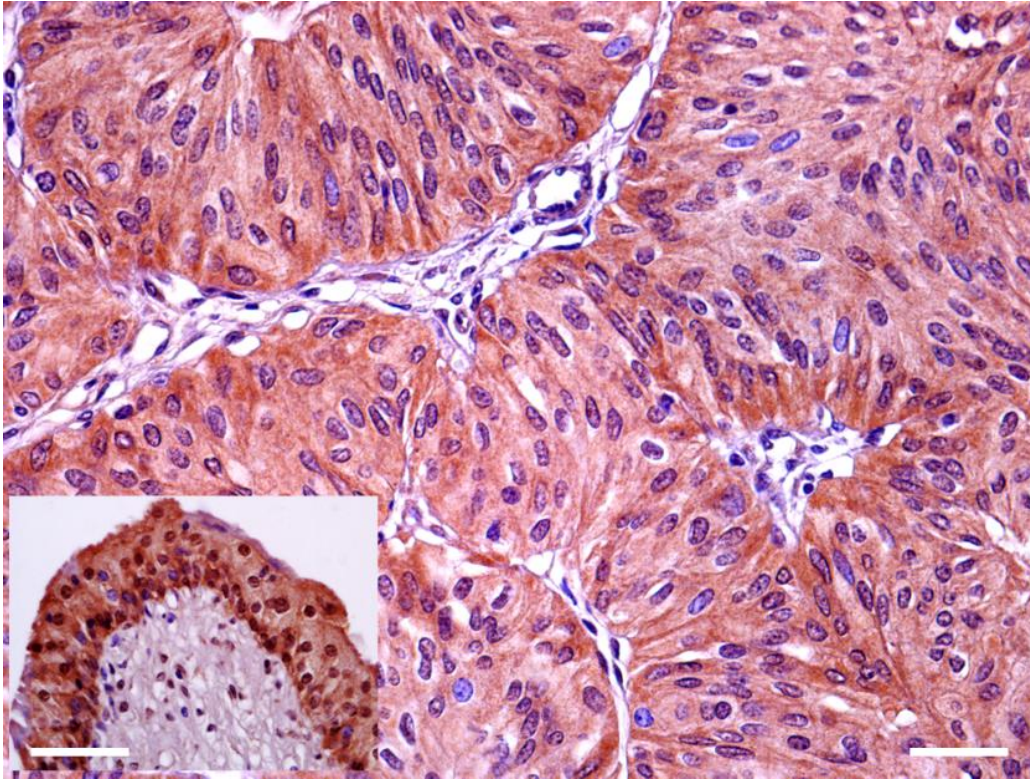


Fig. 16. **IHC ERas.** La overespressione della proteina ERas rilevata mediante immunoistochimica è chiaramente evidente nel citoplasma delle cellule tumorali uroteliali. Nel riquadro: espressione della proteina ERas prevalentemente nucleare nelle cellule uroteliali normali. Ingrandimento, 40X.

L'RT-PCR ha rivelato la presenza di trascritti di ERas, mentre il sequenziamento ha mostrato una omologia di sequenza del 99% con la proteina ERas di *Bos taurus*, depositato in GenBank (numero adesione XM_0052000773.1). ERas risulta costitutivamente espresso in tutti i campioni vescicali analizzati. Un aumento statisticamente significativo dei livelli di mRNA di ERas è stato, invece, riscontrato in vesciche patologiche dalla qRT-PCR (Fig. 17).

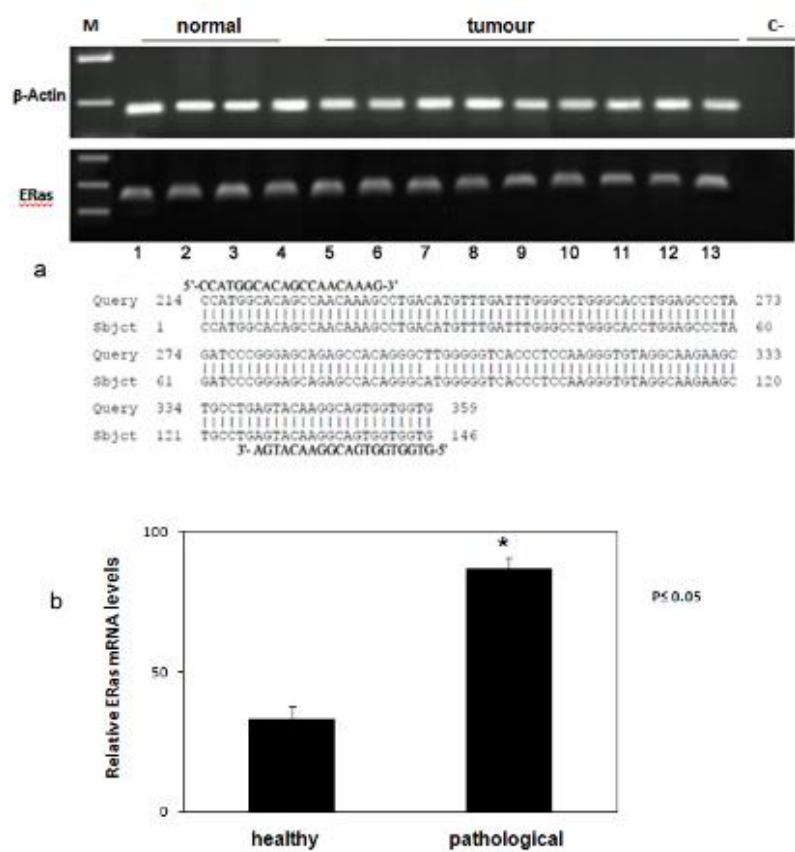


Fig. 17. **PCR amplificazione e sequenziamento di ERas cDNA.** (x) Corsia M: indicatore di massa molecolare (DNA Ladder 1 kb, Microtech). Linee 1-4: campioni controllo di bovini sani. Linee 5-13: campioni di vesciche tumorali. Corsia C: controllo negativo (senza DNA aggiunto). (a) La parte inferiore della figura mostra il 99% di omologia tra la sequenza degli ampliconi (nelle linee 5-13) e la sequenza di ERas bovino depositata in GenBank (numero di accesso: XM_005200773.1). (b) qRT-PCR per ERas. I livelli di espressione di mRNA di Eras, in tessuti neoplastici, sono stati calcolati con il metodo $\Delta\Delta CT$ e sono stati comparati con quelli dei tessuti di vescica sana. I valori sono stati normalizzati valutando l'espressione del gene housekeeping della β actina. I risultati rappresentano le medie e le deviazioni standard di tre esperimenti eseguiti in triplicato. (*, $p \leq 0.05$, vs vescica urinaria di animali sani).

Svariate prove indicano un possibile cross-talk tra i segnali a valle di pPDGFβR, un partner chiave dell'oncoproteina E5 dei Deltapapillomavirus, e il pathway molecolare di ERas. Precedenti studi *in vivo* hanno dimostrato che la forma di PDGFβR attivata (fosforilata), risulta essere aumentata nei tumori della vescica. In questo studio abbiamo unito questi dati e abbiamo dimostrato che la forma fosforilata del PDGFβR è aumentata in lisati totali di campioni tumorali rispetto a quelli sani (Fig. 18).

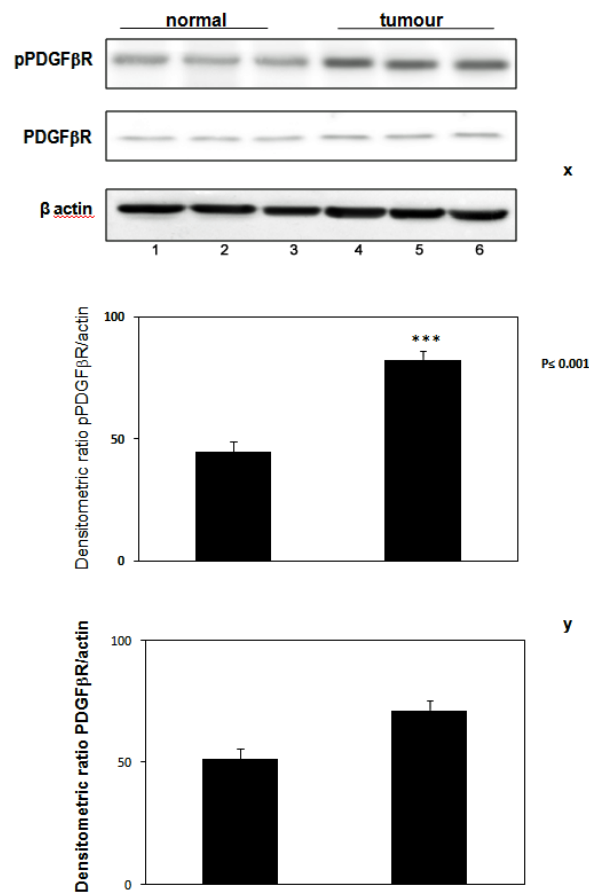


Fig. 18. **Espressione PDGFβR totale e fosforilato.** (x) L'analisi di Western blot ha rilevato un immutato PDGFβR totale nei campioni normali e tumorali. I livelli di pPDGFβR sono risultati aumentati in campioni tumorali. Linee 1-3: campioni di vescica urinaria di animali sani. Linee 4-6: campioni di tessuti di bovini con tumori della vescica associati a papillomavirus. I livelli di espressione dell'actina sono stati analizzati per la normalizzazione. (y) L'analisi densitometrica è stata effettuata con il software Image Lab (ChemiDoc; Bio - Rad Laboratories) e la significatività è stata determinata mediante il test T di Student (***, $p \leq 0.001$).

E' stato condotto anche uno studio di coimmunoprecipitazione e il PDGF β R così come il pPDGF β R sono stati rilevati mediante Western Blot in immunoprecipitati anti-ERas (Fig. 19).

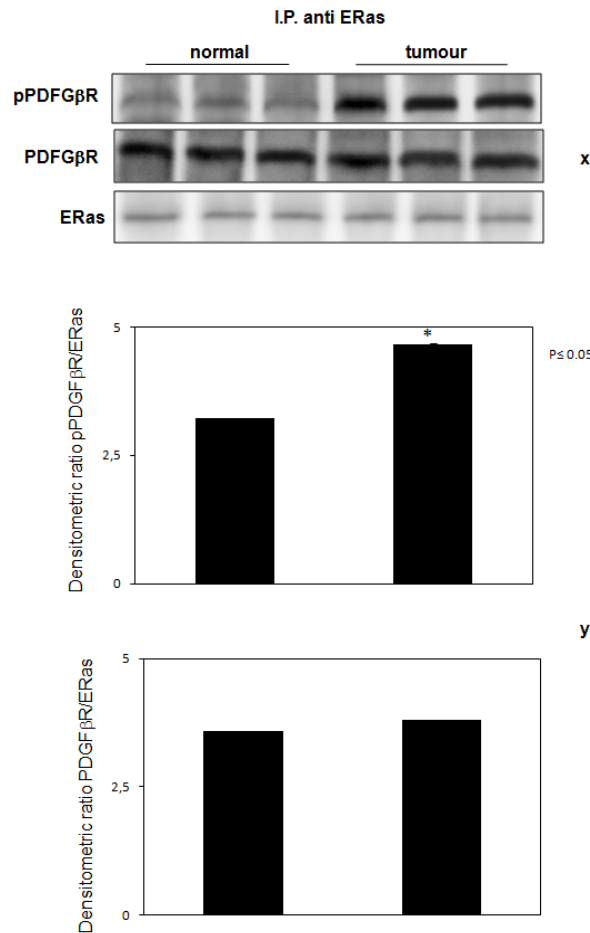


Fig. 19. **PDGF β R ed ERas co-immunoprecipitazione.** La presenza di PDGF β R fosforilata e totale è stata rilevata in immunoprecipitati anti-ERas. Linee 1-3: campioni di vescica urinaria di bovini sani. Linee 4-6: campioni di tessuti di bovini con tumori della vescica associati a papillomavirus. (y) L'analisi densitometrica è stata effettuata con il software Image Lab (ChemiDoc, Bio-Rad Laboratories) e la significatività è stata determinata mediante il test T di Student (*, $p \leq 0.05$).

Il Western Blot ha permesso, inoltre, di rilevare la proteina ERas negli immunoprecipitati anti-PDGF β R ed anti-pPDGF β R (Fig. 20). L'interazione tra ERas e pPDGF β R sembra aumentare notevolmente nei campioni tumorali rispetto a quelli sani.

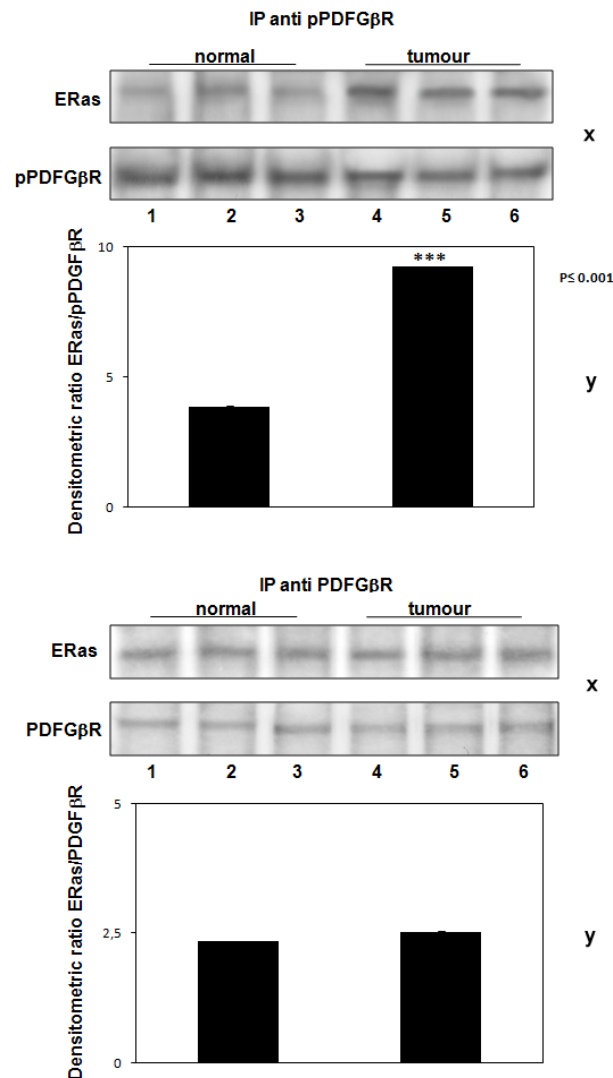


Fig. 20. **pPDGF β R ed ERas co-immunoprecipitazione.** La presenza di ERas è stata rilevata in immunoprecipitati anti-pPDGF β R. L'interazione tra ERas e pPDGF β R è risultata aumentata in immunoprecipitati derivati da tessuti patologici. Invece, l'interazione tra ERas e PDGF β R totale risulta inalterata nei tessuti patologici rispetto ai tessuti sani. Linee 1-3: campioni di vescica urinaria di bovini sani. Linee 4-6: campioni di tessuti di bovini con tumori della vescica associati a papillomavirus. (y) L'analisi densitometrica è stata effettuata con il software Image Lab (ChemiDoc, Bio-Rad Laboratories) e la significatività è stata determinata mediante il test T di Student (***, $p \leq 0.001$).

Morfologicamente, il complesso pPDGF β R-ERas è stato dimostrato anche mediante microscopia confocale. ERas e la forma attivata del PDGF β R risultano co-localizzati, come mostrato dalla fluorescenza gialla delle immagini unite (Fig. 21).

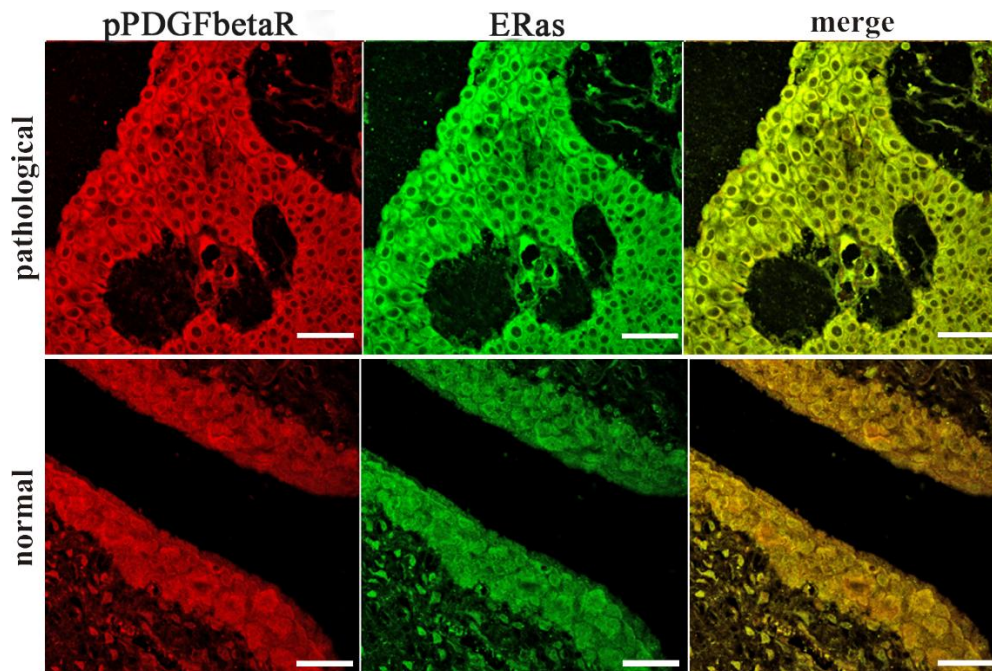


Fig. 21. **Colocalizzazione di pPDGF β R ed ERas.** Carcinoma uroteliale. L'immunofluorescenza mostra la colocalizzazione di ERas e di pPDGF β R (fluorescenza gialla) nelle cellule tumorali uroteliali. Ingrandimento, 40X.

Inoltre, abbiamo rilevato la co-localizzazione di ERas / E5 oncoproteina (Fig. 22) e la co-localizzazione di pPDGF β R/E5 oncoproteina (Fig. 23). Questi risultati suggeriscono che l'oncoproteina E5 interagisce con ERas attraverso il PDGF β R attivato, quindi sembra formarsi un complesso ternario composto da ERas / pPDGF β R / E5 nei tumori uroteliali della vescica bovina.

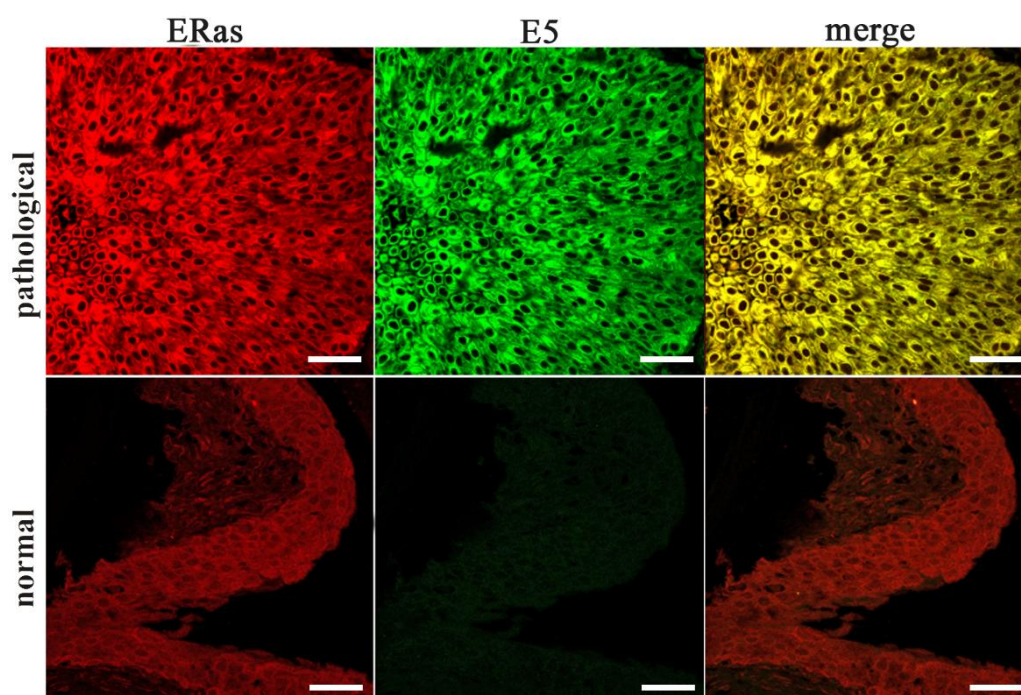


Fig. 22. **Colocalizzazione di ERas ed E5.** Carcinoma uroteliale. L'immunofluorescenza mostra la colocalizzazione di ERas ed E5 nelle cellule tumorali uroteliali (fluorescenza gialla). Nessuna immunofluorescenza per E5 è osservabile nell'epitelio controllo di vescica sana. Ingrandimento, 40X.

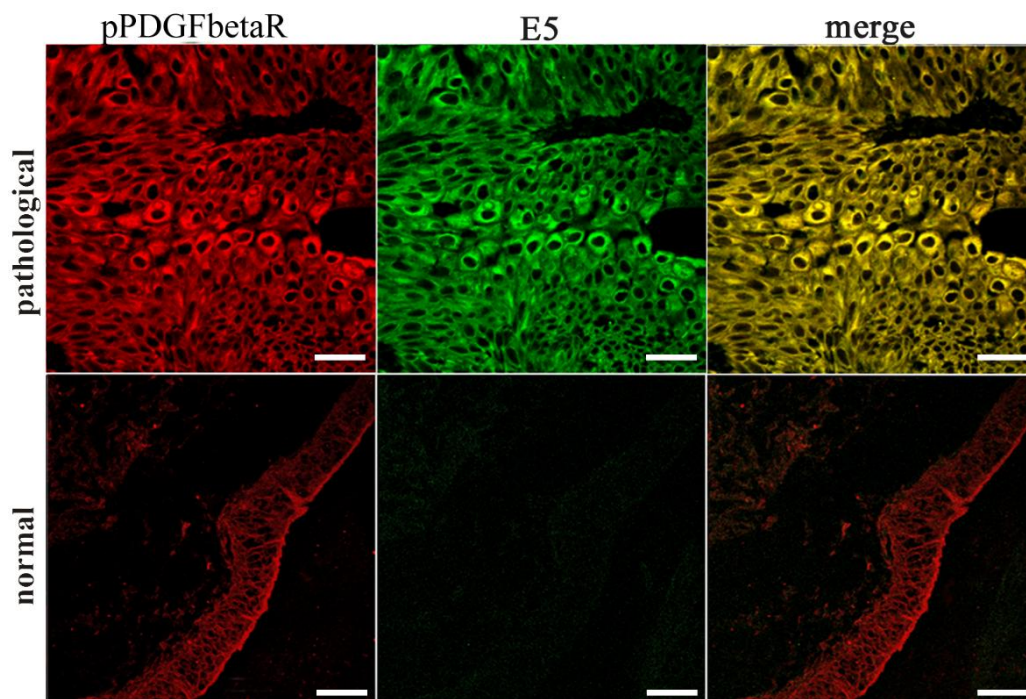


Fig. 23. **Colocalizzazione di pPDGF β R ed E5.** Carcinoma uroteliale. L'immunofluorescenza mostra la colocalizzazione di pPDGF β R ed E5 nelle cellule tumorali uroteliali (fluorescenza gialla). L'epitelio controllo di vescica sana non mostra immunofluorescenza per E5. Ingrandimento, 40X.

Anche per Akt, proteina chinasi, effettore a valle sia del pathway di ERas che del PDGF β R attivato abbiamo effettuato analisi di Western Blot, per individuare sia la componente totale che fosforilata. Non è stato rilevato alcun cambiamento nei livelli totali di AKT tra campioni di vesciche normali e tumorali, ma la parte fosforilata di Akt è stata riscontrata aumentata nelle cellule tumorali uroteliali in maniera statisticamente significativa (Fig. 24).

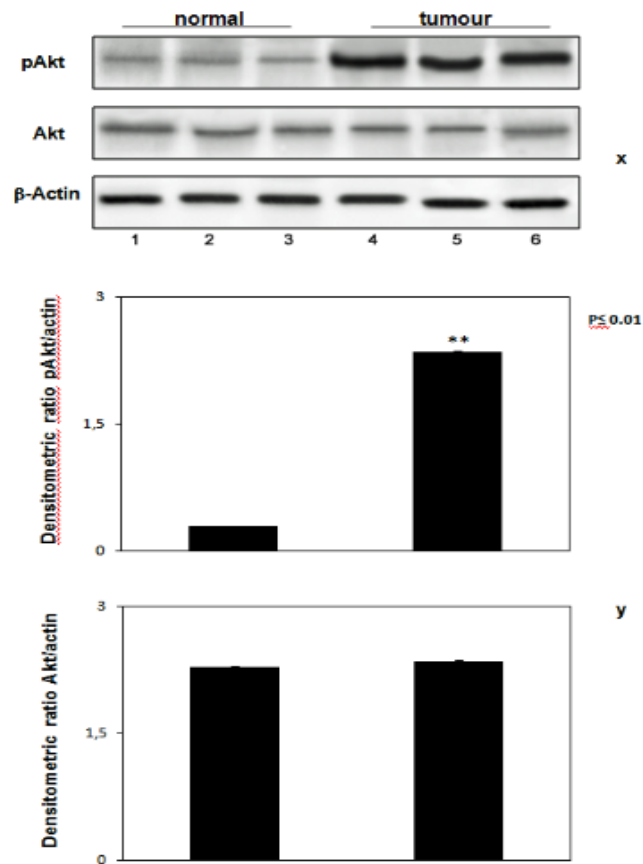


Fig. 24. **Espressione di Akt totale e fosforilato.** (x) L'analisi di **Western Blot** ha rilevato livelli invariati di Akt totale nei tessuti normali e patologici; la forma attiva, fosforilata, di Akt è risultata, invece, aumentata nei tessuti tumorali. Linee 1-3: campioni di vescica urinaria di animali sani. Linee 4-6: campioni di tessuti di bovini con tumori della vescica associati a papillomavirus. I livelli di espressione dell'actina sono stati analizzati per la normalizzazione. (y) L'analisi densitometrica è stata effettuata con il software Image Lab (ChemiDoc; Bio - Rad Laboratories) e la significatività è stata determinata mediante il test T di Student (**, $p \leq 0.01$).

4. BIBLIOGRAFIA

- Alonso-Amelot M.E. & Avendano M. *Human carcinogenesis and bracken fern: a review of the evidence*. Curr Med Chem. 9: 675-686, 2002.
- Anderson R.A., Scobie L., O'Neil B.W., Grindlay G.J., Campo M.S. *Viral proteins of bovine papillomavirus type 4 during the development of alimentary canal tumours*. Vet. J. 69-78, 1997.
- Balcos L.G., Borzacchiello G., Russo V., Popescu O., Roperto S., Roperto F. *Association of bovine papillomavirus type – 2 and urinary bladders tumours in cattle from Romania*. Res. Vet. Sci. 85: 145 – 148, 2008.
- Behler F., Maus R., Bohling J., Knippenberg S., Kirchhof G., Nagata M., et al. *Macrophage-inducible C-type lectin Mincle-expressing dendritic cells contribute to control of splenic Mycobacterium bovis BCG infection in mice*. Infect Immun. 83:184–196. 10.1128/IAI.02500-14, 2015.
- Bernard H.U., Burk R.D., Chen Z., van Doorslaer K., Hausen H. & de Villiers E.M. *Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments*. Virol. 401: 70–79, 2010.
- Bjeldanes L.F. & Chang G.W. *Mutagenic activity of quercetin and related compounds*. Science. 197: 577-578, 1977.
- Borzacchiello G., Ambrosio V., Roperto S., Poggiali F., Tsirimonakis E., Venuti A., Campo M.S., Roperto F. *Bovine papillomavirus type 4 in oesophageal papillomas in cattle from the south of Italy*. J Comp Path. 128: 203-206, 2003.
- Borzacchiello G., Iovane G., Marcante M.L., Poggiali F., Roperto F., Roperto S., Venuti A. *Presence of bovine papillomavirus type 2 DNA and expression of the viral oncoprotein E5 in naturally occurring urinary bladder tumors in cows*. J Gen Virol. 84: 2921- 2926, 2003.
- Borzacchiello G., Russo V., Gentile F., Roperto F., Venuti A., Nitsch L., Campo M. S., Roperto S. *Bovine papillomavirus E5 oncoprotein binds to the activated form of the platelet-derived growth factor b receptor in naturally occurring bovine urinary bladder tumours*. Oncogene. 25: 1251–1260, 2006.
- Borzacchiello G., Russo V., Spoleto C., Roperto S., Balcos L., et al. *Bovine papillomavirus type – 2 DNA expression of E5 and E7 oncoproteins in vascular tumours of the urinary bladder in cattle*. Cancer Letters. 250: 82 – 91, 2007.
- Borzacchiello G., Roperto F. *Bovine papillomaviruses, papillomas and cancer in cattle*. Veterinary Research. 39: 45, 2008.
- Bottalico D., Chen Z., Kocjan B.J., Seme K., Poljak M. & Burk R.D. *Characterization of human papillomavirus type 120: a novel betapapillomavirus with tropism for multiple anatomical niches*. J Gen Virol. 93: 1774–1779, 2012.

- Burkhardt A., Willingham M., Gay C., Jeang K.T., Schlegel R. *The E5 oncoprotein of bovine papillomavirus is oriented asymmetrically in Golgi and plasma membranes*. Virol 170: 334-339, 1989.
- Burnett S., Jareborg N., Di Maio D. *Localization of bovine papillomavirus type 1 E5 protein to transformed basal keratinocytes and permissive differentiated cells in fibropapilloma tissue*. Proc Natl Acad Sci. 89: 5665-5669, 1992.
- Campo M.S., Jarrett W.F.H., Barron R., O'Neil B.W., Smith K.T. *Association of bovine Papillomavirus Type 2 and bracken fern with bladder cancer in cattle*. Cancer Research. 52: 6898-6904, 1992.
- Campo M.S., Jarrett W.F.H., O'Neil B.W., Barron R.J. *Latent papillomavirus infection in cattle*. Res. Vet. Sci. 56: 151-157, 1994.
- Campo M.S., O'Neil B.W., Barron R.J., Jarrett W.F. *Experimental reproduction of the papilloma - carcinoma complex of the alimentary canal in cattle*. Carcinogenesis. 15: 1597 - 1601, 1994.
- Campo M.S. *Bovine papillomavirus and cancer*. Veterin. Journal. 154: 175 – 188, 1997.
- Campo M.S. *Animal models of papillomavirus pathogenesis*. Virus Res. 89:249-261, 2002.
- Campo M.S. *Papillomavirus and disease in human and animals*. Vet. Comp. Oncol. 1: 3 – 14, 2003.
- Campo M.S. *Papillomavirus research (from natural history to vaccines and beyond)*. Caister Academic Press, 2006.
- Castillo U.F., Ojika M., Alonso-Amelot M.E., Sakagami Y. *Ptaquiloside Z, a new toxic unstable sesquiterpene glucoside from the neotropical bracken fern Pteridium aquilinum var. caudatum*. Bioorganic and Medicinal Chemistry. 9: 2229-2233, 1998.
- Chang J.L., Tsao Y.P., Liu D. W., Huang S.J., Lee W.H., Chen S.L. *The expression of HPV-16 E5 protein in squamous neoplastic changes in the uterine cervix*. J. Biomed Sci. 8: 206-213, 2001.
- Ciuffo G. *Innesto positivo con filtrato di verruca volgare*. Giorn Ital Mal Venereol. 48: 12-17, 1907.
- Conger K.L., Liu J.S., Kuo S.R., Chow L.T., Wang T.S. *Human papillomavirus DNA replication. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human DNA polymerase alpha/primase*. J Biol Chem. 274(5):2696-705, 1999.
- Corteggio A., Urraro C., Roperto S., Roperto F., Borzacchiello G. *Phosphatidylinositol-3-kinase-AKT pathway, phospho-JUN and phospho-JNK expression in spontaneously arising bovine urinary bladder tumours*. J Comp Pathol. 143: 173-178, 2010.
- de Villiers E-M., Fauquet C., Broker T.R., Bernard H-U., zur Hausen H. *Classification of papillomavirus*. Virology. 324: 17-27, 2004.

- Dixon E.P., Pahel G.L., Rocque W.J., Barnes J.A., Lobe D.C., Hanlon M.H., Alexander K.A., Chao S.F., Lindley K., Phelps W.C. *The E1 helicase of human papillomavirus type 11 binds to the origin of replication with low sequence specificity*. Virology. 270(2): 345-57, 2000.
- Doorbar J., Ely S., Sterling J., McLean C., Crawford L. *Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network*. Nature. 352(6338): 824-7, 1991.
- Dyson N. *The regulation of E2F by pRB-family proteins*. Genes Dev. 12(15):2245-62, 1998.
- Eble J.N., Sauter G., Epstein J.I. et al. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs*. IARC Press, Lyon, 2004.
- Evans I.A. & Mason J. Nature. 208: 913-914, 1965.
- Evans I.A. *The radiomimetic nature of bracken toxin*. Cancer Res. 28, 2252-2261, 1968.
- Evans W.C. *Bracken thiaminase-mediated neurotoxic syndroms*. Bot. J. Linn. Soc. 73, 113-131, 1976.
- Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M. (eds) *Fields Virology*, Philadelphia, Lippincott-Raven, 1990.
- Frattoni M.G. & Laimins L.A. *The role of the E1 and E2 proteins in the replication of human papillomavirus type 31b*. Virology. 204(2):799-804, 1994.
- Gava, D. da Silva Neves, D. Gava et al. *Bracken Fern (Pteridium aquilinum) poisoning in cattle in southern Brazil*. Veterinary and Human Toxicology. 44:6, 362-365, 2002.
- Georgijev R., Vrigosov A., Antonov S., Dimitrov A., Versuche zur Feststellung der Anwesenheit kanzerogener Stoffe im Harn in mit Heu aus Hämaturiegebieten gefütterten Kühen, Wien. Tierarztl. Mschr, 50:589-595, 1963.
- Goldstein D.J., Finbow T., Andresson T., Mc Lean P., Smith K., Bubb R., Schlegel R. *Bovine papillomavirus E5 oncoprotein binds to the 16-K component of vacuolar H(+)-ATPases*. Nature. 352, 347-349, 1991.
- Graham S.V. *Late events in the life cycle of human papillomavirus*. In: Campo MS, editor. Papillomavirus Research - from Natural History to Vaccines and Beyond. 193 – 211, Norfolk, UK: Caister Academic Press, 2006.
- Hirono I., Shibuya C., Fushimi K., Haga M. *Studies on Carcinogenic Properties of Bracken, Pteridium Aquilinum*, J. Natl. Cancer Inst. 45, 182-188, 1970.
- Hirono I., Hosaka S., Kuhara K. *Enhancement by bracken of induction of tumours of upper alimentary tract by N-propyl-N-Nitrosourethane*. Br. J. Cancer. 46, 423-427, 1982.
- Hirono I., Aiso S., Hosaka S., Yamaji T., Haga M. *Induction of mammary cancer in CD rats fed bracken diet*. Carcinogenesis. 4, 883-887, 1983.

- Hirono I., Kono Y., Takahashi K., Yamada K., Niwa H., Ojika M., Kigoshi H., Hiiyama K., Uosaki Y. *Reproduction of acute bracken poisoning in a calf with ptaquiloside, a bracken constituent.* Vet. Rec. 115, 375-378, 1984.
- Hughes F.J. & Romanos M.A. *E1 protein of human papillomavirus is a DNA helicase/ATPase.* Nucleic Acids Res. 21(25):5817-23, 1993.
- IARC. *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.* Human Papillomaviruses, vol. 90. Lyon: IARC Press, 2007.
- Ishikawa E., Ishikawa T., Morita Y.S., Toyonaga K., Yamada H., Takeuchi O., et al. *Direct recognition of the mycobacterial glycolipid, trehalose dimycolate, by C-type lectin Mincle.* J Exp Med. 206:2879–2888, 2009.
- Jarrett W.F.H., Mc Neal P.E., Grimshaw W.T.R., Selman I.E., McIntyre W.I.M. *High incidence area of cattle cancer with a possible interaction between an environmental carcinogen and a papillomavirus.* Nature. 274: 215 – 217, 1978.
- Jarrett W.F., Campo M.S., O'Neil B.W., Laird H.M., Coggins L.W. *A novel bovine papillomavirus (BPV - 6) causing true epithelial papillomas of the mammary gland skin: a member of a proposed new BPV subgroup.* Virology. 136 (2): 255 -264, 1984.
- Jarrett W.F.H. *The natural history of bovine papillomavirus infections.* Advances in Viral Oncology. 5: 83-102, 1985.
- Johansson C., Somberg M., Li X., Backström Winqvist E., Fay J., et al. *HPV-16 E2 contributes to induction of HPV-16 late gene expression by inhibiting early polyadenylation.* EMBO J 31: 3212 – 3227, 2012.
- Kaizaki R., Yashiro M., Shinto O., Yasuda K., Matsuzaki T., et al. *Expression of ERas oncogene in gastric carcinoma.* Anticancer Res 29: 2189-2193. 2009.
- Kubota E., Kataoka H., Aoyama M., Mizoshita T., Mori Y., et al. *Role of ES cell-expressed Ras (ERas) in tumorigenicity of gastric cancer.* Am J Pathol. 177: 955-963, 2010.
- Laimins L.A. *Regulation of transcription and replication by human papillomaviruses,* p. 201-223. In D. J. McCance (ed.), Human tumor viruses. American Society for Microbiology, Washington, D.C, 1998.
- Lecis R., Tore G., Scagliarini A., Antuofermo E., Dedola C., Cacciotto C., Dore G.M., Coradduzza E., Gallina L., Battilani M., Anfossi A.G., Muzzeddu M., Chessa B., Pittau M., Alberti A. *Equus asinus papillomavirus (EaPV1) provides new insights into equine papillomavirus diversity.* Vet Microbiol. 170(3-4):213-23, 2014.
- Lioi M.B., Barbieri R., Borzacchiello G., Dezzi S., Roperto S., et al. *Chromosome aberrations in cattle with chronic enzootic haematuria.* J. Comp. Path. 131: 233-236, 2004.
- Liu Y., Wang Z., Li H., Wu Z., Wei F., et al. *Role of the ERas gene in gastric cancer cells.* Oncol Rep 30: 50-56, 2013.

- Lott S., Lopez-Beltran A., MacLennan G.T. et al. *Soft tissue tumors of the urinary bladder, Part I: myofibroblastic proliferations, benign neoplasms, and tumors of uncertain malignant potential*. Human Pathology. 38:6, 807-823, 2007.
- Lu J.Z., Sun Y.N., Rose R.C., Bonnez W., McCance D.J. *Two E2 binding sites (E2BS) alone or one E2BS plus an A/T-rich region are minimal requirements for the replication of the human papillomavirus type 11 origin*. J Virol. 67:7131-7139, 1993.
- Lunardi M., Alfieri A.A., Otonel R.A., de Alcantara B.K., Rodrigues W.B., de Miranda A.B., Alfieri A.F. *Genetic characterization of a novel bovine papillomavirus member of the Deltapapillomavirus genus*. Vet Microbiol. 162: 207-13, 2013.
- Marchetti B., Ashrafi G.H., Tsirimonaki E., O'Brien P.M., Campo M.S. *The bovine papillomavirus oncoprotein E5 retains MHC class I molecules in the Golgi apparatus and prevents their transport to the cell surface*. Oncogene. 21:7808-7816, 2002.
- Masterson P.J., Stanley M.A., Lewis A.P., Romanos M.A. *A C-terminal helicase domain of the human papillomavirus E1 protein binds E2 and the DNA polymerase alpha-primase p68 subunit*. J Virol. 72(9):7407-19, 1998.
- Matsumoto M., Tanaka T., Kaisho T., Sanjo H., Copeland N.G., Gilbert D.J., et al. *A novel LPS-inducible C-type lectin is a transcriptional target of NF-IL6 in macrophages*. J Immunol. 163:5039–5048, 1999.
- Maxie M.G., Newman S.J. *The urinary system*. In: Maxie, M.G. ed. Jubb, Kennedy, Palmer's Pathology of Domestic Animals, 5th ed, Saunders - Elsevier, Edinburgh, 518 – 520, 2007.
- McKenzie R.A. *Bovine enzootic haematuria in Queensland (F)*. Vet. J. 54, 61-64, 1978.
- Meuten D.J. *Tumors of the urinary bladder and urethra*. In: Tumors in Domestic Animals, D.J Meuten, Ed., Iowa State Press, Ames, 524 – 546, 2002.
- Miyake Y., Ishikawa E., Ishikawa T., Yamasaki S. *Self and nonself recognition through C-type lectin receptor, Mincle*. Self Nonself; 1:310–313, 2010.
- Moody C.A. & Laimins L.A. *Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation*. Nat Rev Cancer. 10(8):550-60, 2010.
- Muller F., Giroglou T., Sapp. M. *Characterization of the DNA-binding activity of the E1 and E2 proteins and the E1/E2 complex of human papillomavirus type 33*. J Gen Virol. 78 (4):911-5, 1997.
- Muller M., Jacob Y., Jones L., Weiss A., Brino L., et al. *Large scale genotype comparison of human papillomavirus E2-host interaction networks provides new insights for E2 molecular functions*. PLoS Pathog. 8 (6), 2012.
- Munday J.S., Thomson N., Dunowska M., Knight C.G., Laurie R.E., Hills S. *Genomic characterisation of the feline sarcoid-associated papillomavirus and proposed classification as Bos taurus papillomavirus type 14*. Vet Microbiol. 177(3-4):289-95, 2015.

- Nakayasu M., Sakamoto H., Terada M., Nagao M., Sugimura T. *Mutagenicity of quercetin in Chinese hamster lung cells in culture*. Mutat. Res. 174:79-83, 1986.
- Olson C., Pamukcu, A.M., Brobst, D.F. *Papilloma like-virus from bovine urinary bladder tumors*. Cancer Res. 25: 840-849, 1965.
- Pamukcu A.M., Price J.M., Bryan G.T. *Naturally occurring and bracken-fern-induced bovine urinary bladder tumours*. Vet Pathol. 13: 110-122, 1976.
- Pamukcu A.M., Erturk E., Yalciner S., Milli U., Bryan G.T. Cancer Res. 38: 1556-1570, 1978.
- Pennie W.D., Grindlay G.J., Cairney M., Campo M.S. *Analysis of the transforming functions of bovine papillomavirus type 4*. Virology. 193, 614-620, 1993.
- Radostitis, O.M., Blood, D.C. and Gay, C.C. *Veterinary Medicine*, 8th edition. Baillière Tindall, 1559-1562, 1994.
- Rector A., Van Ranst M. *Animal papillomaviruses*. Virology. 445, 213-223, 2013.
- Rogovskyy A.S., Baszler T.V., Bradway D.S., Bruning D.L., Davitt C.M., Evermann J.F., Burk R.D., Chen Z., Mansfield K.G. & Haldorson G.J. *A novel papillomavirus isolated from proliferative skin lesions of a wild American beaver (Castor canadensis)*. J Vet Diagn Invest. 24, 750–754, 2012.
- Roperto S., Brun R., Paolini F., Urraro C., Russo V., Borzacchiello G., Pagnini U., Raso C., Rizzo C., Roperto F., Venuti A. *Detection of bovine papillomavirus type 2 in the peripheral blood of cattle with urinary bladder tumors: possible biological role*. J Gen Virol, 89: 3027-3033, 2008.
- Roperto S., Borzacchiello G., Brun R., Leonardi L., Maiolino P., Martano M., Paciello O., Papparella S., Restucci B., Russo V., Salvatore G., Urraro C., Roperto F. *A review of Bovine Urothelial Tumours and Tumour-Like Lesions of the Urinary Bladder*. J Comp Path, 2010.
- Roperto S., De Tullio R., Raso C., Stifanese R., Russo V., Gaspari M., Borzacchiello, G., Averna M., Paciello O. et al. *Calpain3 is expressed in a proteolitically active form in papillomavirus-associated urothelial tumors of the urinary bladder in cattle*. PLoS One. 5, e10299, 2010.
- Roperto S., Comazzi S., Ciusani E., Paolini F., Borzacchiello G., Esposito I., Lucà R., Russo V., Urraro C., Venuti A., Roperto F. *PBMCs are additional sites of productive infection of bovine papilloma virus type 2*. J Gen Virol. 92(Pt 8):1787-94, 2011.
- Roperto S., Paciello O., Borzacchiello G., Esposito I., Riccardi M.G., Lucà R., Urraro C., Ceccarelli D.M., Russo V., Roperto F. – *Is Bag 3 protein involved in autophagic mechanisms in papilloma virus-associated urothelial tumors in cattle?* – Proceedings 30th Meeting of European Society of Veterinary Pathology and European College of Veterinary Pathologists – ESVP/ECVP Leon, Spain, 67, 2012.
- Roperto S., Russo V., Ozkul A., Sepici-Dincel A., Maiolino P., Borzacchiello G., Marcus I., Esposito I., Riccardi M.G. and Roperto F. *Bovine papillomavirus type 2 infects the urinary*

bladder of water buffalo (Bubalus bubalis) and plays a crucial role in bubaline urothelial carcinogenesis. J. Gen. Vir. 94, 403-408, 2013.

Roperto S., Russo V., Ozkul A., Corteggio C., Sepici-Dincel A., Catoi C., Esposito I., Riccardi M.G., Urraro C., Lucà R., Ceccarelli D.M., Longo M., Roperto F. *Productive infection of bovine papillomavirus type 2 in the urothelial cells of naturally occurring urinary bladder tumors in cattle and water buffalo. PLoS One. 8: e62227, 2013.*

Roperto S., Russo V., Borzacchiello G., Urraro C., Lucà R., Esposito I., Riccardi M.G., Raso C., Gaspari M., Ceccarelli D.M., Galasso R., Roperto F. *Bovine papillomavirus type 2 (BPV-2) E5 oncoprotein binds to the subunit D of the V₁-ATPase proton pump in naturally occurring urothelial tumors of the urinary bladder of cattle. PLoS One. 24;9(2):e88860, 2014.*

Roperto S., Russo V., Esposito I., Ceccarelli D.M., Paciello O., Avallone L., Capparelli R., Roperto F. *Mincle, an Innate Immune Receptor, Is Expressed in Urothelial Cancer Cells of Papillomavirus-Associated Urothelial Tumors of Cattle. PLoS One. 29;10(10): e0141624, 2015.*

Roperto S., Russo V., Leonardi L., Martano M., Corrado F., Riccardi M.G., Roperto F. *Bovine Papillomavirus Type 13 Expression in the Urothelial Bladder Tumours of Cattle. Transbound Emerg Dis. 10.1111/tbed.12322, 2015.*

Roperto S., Munday J., Russo V., Corrado F., Gorla M., Roperto F. *Detection of Bovine Papillomavirus Type 14 sequences in Urothelial Tumours in Cattle. Vet Microbiol., in press, 2016.*

Rosenberger G. & Heeschen W., Dtsch Tierärztl. Wochenschr. 67: 201-208, 1960.

Rowson K.E.K. & Mahy B.W.J. *Human Papova (Wart) Virus. Bacteriol. Reviews, 31, 110-131, 1967.*

Russo V., Roperto F., Esposito I., Ceccarelli D.M., Zizzo N., Leonardi L., Capparelli R., Borzacchiello G., Roperto S. *ERas protein is overexpressed and binds to the activated platelet-derived growth factor β receptor in bovine urothelial tumour cells associated with papillomavirus infection. Vet J., in press, 2016.*

Savini F., Gallina L., Alberti A., Müller M., Scagliarini A. *Bovine papillomavirus type 7 in Italy: complete genomes and sequence variants. Virus Genes. 2016.*

Scagliarini A., Gallina L., Battilani M., Turrini F, Savini F., Lavazza A., Chiari M., Coradduzza E., Peli A., Erdélyi K., Alberti A. *Cervus elaphus papillomavirus (CePVI): new insights on viral evolution in deer. Vet Microbiol. 30;165 (3-4):252-9, 2013.*

Schoenen H., Bodendorfer B., Hitchens K., Manzanero S., Werninghaus K., Nimmerjahn F., et al. *Cutting edge:Mincle is essential for recognition and adjuvant activity of the mycobacterial cord factor and its synthetic analog trehalose-dibehenate. J Immunol.184:2756–2760, 2010.*

- Sedman J., Stenlund A. *The papillomavirus E1 protein forms a DNA-dependent hexameric complex with ATPase and DNA helicase activities*. J Virol. 72(8):6893-7, 1998.
- Seo Y.S., Müller F., Lusky M., Gibbs E., Kim H.Y., Phillips B., Hurwitz J. *Papillomavirus (BPV)-encoded E2 protein enhances binding of E1 protein to the BPV replication origin*. Proc Natl Acad Sci U S A. 90(7):2865-9, 1993.
- Seo Y.S., Müller F., Lusky M., Hurwitz J. *Bovine papillomavirus (BPV)-encoded E1 protein contains multiple activities required for BPV DNA replication*. Proc Natl Acad Sci U S A. 90(2):702-6, 1993.
- Shahin M., Moore M.R., Worrall S., Smith B.L., Seawright A.A., Prakash A.S. *H-ras activation is an early event in the ptaquiloside- induced carcinogenesis: comparision of acute and chronic toxicity in rats*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 250: 491-497, 1998.
- Smith B.L., Embling P.P., Agnew M.P., Lauren D.R., Holland P.T. *Carcinogenicity of bracken fern (Pteridium esculentum) in New Zealand*. N.Z. Vet. J. 36, 56-58, 1988.
- Smith B.L., Seawright A.A., Ng J.C., Hertle A.T., Thomson J.A., Bostock P.D. *Concentration of ptaquiloside, a major carcinogen in bracken fern (Pteridium spp), from eastern Australia and from a cultivated worldwide collection held in Sydney, Australia*. Nat. Toxins 2, 347-353, 1994.
- Smith B.L., Shaw G., Prakash A.S., Seawright A.A. *Studies on Dna formation by ptaquiloside, the carcinogen of bracken ferns (Pteridium spp.)*, in: S.M. Colegate, P.R. Dorling (Eds), Plant Associated Toxins: Agricultural, Phytochemical and Ecological Aspects, CAB International, Wallingford, UK, 167-172, 1994.
- Smith, B.L. *The toxicity of bracken fern (genus Pteridium) to animals and its relevance to man*. Handbook of Plant and Fungal Toxicants, J.P.F. D'Mello, Ed., CRC Press, London, 63-76, 1997.
- Somogyi J.C. *On antithiamine factors of fern*. J. Vitaminol. 17, 165-174, 1971.
- Supryniewicz, F. A., Baege, A., Sunitha, I. & Schlegel, R. *c-Src activation by the E5 oncoprotein enables transformation independently of PDGF receptor activation*. Oncogene. 21, 1695–1706, 2002.
- Suzuki Y., Nakano Y., Mishiro K., Takagi T., Tsuruma K., Nakamura M., et al. *Involvement of Mincle and Syk in the changes to innate immunity after ischemic stroke*. Sci Rep. 3: 3177.10.1038/srep03177, 2013.
- Takahashi K., Mitsui K., Yamanaka S. *Role of ERas in promoting tumour-like properties in mouse embryonic stem cells*. Nature. 423: 541-545, 2003.
- Takahashi K., Nakagawa M., Young S.G., Yamanaka S. *Differential membrane localization of Eras and Rheb, two Ras-related proteins involved in the phosphatidylinositol 3-kinase/mTOR pathway*. J Biol Chem. 280:32768-32774, 2005.

Taylor J.A. *The bracken problem: a global perspective*. AIAS Occasional Publication, No. 40, 3-19, 1990.

Tryon R.M. *A revision of the genus pteridium*. J.N. Engl. Bot. Club 43, 1- 66, 1941.

Venuti A., Campo M.S. *The E5 protein of papillomavirus*, in: D. McCance (Ed.), *human Papillomavirus- Perspectives in medical Virology*, vol.8, Elsevier Science B.V., Amsterdam, 143-164, 2002.

Venuti A., Paolini F., Nasir L., Corteggio A., Roberto S., et al. *Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions*. Molecular Cancer. 10: 140, 2011.

Villalobos- Salazar J., Meneses A., Rojas J.L., Mora J., Porras R.E., Herrero M.V. *Bracken-derived carcinogens as affecting animal health and human health in Costa Rica*, presented at International Bracken Group Meeting, Bangor, Wales, 1989.

Virgilio A., Sinisi A., Russo V., Gerardo S., Santoro A., Galeone A., Tagliatella-Scafati O., Roberto F. *Ptaquiloside, the major carcinogen of bracken fern, in the pooled raw milk of healthy sheep and goats: an underestimated, global concern of food safety*. J Agric Food Chem. 20;63(19):4886-92, 2015.

Watson W.A., Barnett K.C., Terlecki S., Vet. Rec. 77: 1060-1069, 1965.

Wosiacki S.R., Barreiro M.A.B., Alfieri A.F., Alfieri A.A. *Semi – nested PCR for detection and typing of bovine papillomavirus type – 2 in urinary bladder and whole blood from cattle with enzootic haematuria*. Journal of Virological Methods. 126: 215 – 219, 2005.

Wosiacki S.R., Claus M.P., Alfieri A.F., Alfieri AA. *Bovine papillomavirus type-2 detection in the urinary bladder of cattle with chronic enzootic haematuria*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 101: 635- 638, 2006.

Yamada K., Ojika M., Kigoshi H. *Ptaquiloside, the major toxin of bracken, and related terpene glycosides: chemistry, biology and ecology*. Nat Prod Rep. 24(4):798-813, 2007.

Yamasaki S., Ishikawa E., Sakuma M., Hara H., Ogata K., Saito T. *Mincle is an ITAM-coupled activating receptor that senses damaged cells*. Nat Immunol. 9:1179–1188, 2008.

Yang L., Mohr I., Fouts E., Lim D.A., Nohaile M., Botchan M. *The E1 protein of bovine papillomavirus 1 is an ATP-dependent DNA helicase*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1;90 (11):5086-90, 1993.

Zhang J., Chen T., Mao Q., Lin J., Jia J., et al. *PDGFR- β -activated ACK1-AKT signaling promotes glioma tumorigenesis*. Int J Cancer, 10.1002/ijc.29234, 2014.

Zhu, W., Dong, J. B., Zhang, J., Uchida, K., Watanabe, K. I., Goto, Y. & Haga, T. *Bos grunniens papillomavirus type 1 (BgPV-1): a novel Deltapapillomavirus associated with fibropapilloma in yak*. J Gen Virol. 94(1):159-65, 2013.